

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Automatizace liberačních testů pro uvolňování biologicky aktivních látek z nanovláken

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce

doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant

Mgr. Martina Háková

Hradec Králové, 2020

Marie Schneidrová

## PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto upřímně poděkovat vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Haně Sklenářové, PhD. za všechny cenné rady, připomínky a ochotu s jakou mi tuto práci pomáhala po celou dobu zpracovávat. Rovněž bych chtěla poděkovat za pomoc a vstřícnost své konzultantce Mgr. Martině Hákové a všem pracovníkům katedry analytické chemie za jejich přátelský přístup a vytváření příjemné atmosféry po celou dobu mého měření.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Marie Schneidrová

Školitel: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Automatizace liberačních testů pro uvolňování biologicky aktivních látek z nanovláken

Tato diplomová práce se zabývá automatizací liberace antibiotika tetracyklinu (TTC) z nanovláčenného nosiče, za využití neseparační průtokové metody sekvenční injekční analýzy. Pro detekci signálu byl používán UV-VIS spektrofotometr. Měření byla realizována za využití 1-3 paralelně zapojených Franzových cel umístěných ve vodní lázni. Jako liberační média byly použity tlumivé roztoky o pH 7,4 a 4,5. Liberace TTC probíhala ze dvou různých nanovláčenných nosičů - typ „A“ a „AK“, lišících se v postupu při své výrobě. Každý z nich tedy vykazoval odlišné vlastnosti, týkající se především množství navázaného TTC a způsobu jeho vazby na nosič. Výroba těchto nanovláčken byla realizována Technickou univerzitou v Liberci za využití technologie NanoSpider™.

Měření probíhala za různých, předem stanovených podmínek, reprezentujících stav lidské kůže - dvě rozdílné hodnoty pH (7,4; 4,5) a teploty (32°C; 37°C). Byly využívány také čtyři různé typy membránových filtrů, které liberační profily v průběhu měření různě ovlivňovaly. Jednalo se o filtry tvořené polyamidovým, polytetrafluorethylenovým, polykarbonátovým materiálem a materiálem vyrobeným z esterů celulózy. Z těchto filtrů byl nakonec vybrán jeden, který měl neoptimálnější vlastnosti pro další měření - liberaci TTC z nosiče optimálně prodloužil tak, že byly dostatečně viditelné rozdíly v testovaných materiálech, ale jinak konkrétní liberační profil příliš neovlivňoval.

Získané liberační profily byly mezi sebou následně porovnány a zhodnoceny. Hlavními sledovanými parametry byla rychlost uvolňování TTC z daného

nanovláknenného nosiče a výsledné hodnoty uvolněného TTC, dosažené při různých podmínkách měření.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Marie Schneidrová

Supervisor: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Automation of liberation tests for releasing biologically active substance from nanofibers

The main goal of this diploma thesis is an automation of TTC liberation from nanofibers, using non-separation flow method sequential injection analysis. UV-VIS spectrophotometer was used for the detection of signal. Measurements were carried out using 1-3 connected Franz cells in parallel, palced in the water bath. Buffer solutions with pH 7.4 and 4.5 were used as liberation media. The liberation of TTC was realized from two different nanofiber carriers – types „A“ and „AK“, Difference was in their preparation process. Because of this, each of them revealed various characteristics mainly related to the amount of bound TTC and the way of its binding to the nanofiber carrier. Production of these nanofibers was realized by Technical University Liberec using the technology NanoSpider™.

Measurements were performed under various predetermined conditions, representing the state of the human skin – two different pH (7.4; 4.5) and temperature (32°C; 37°C) values. Four different types of membrane filters were also used, which influenced the liberation profiles in various ways during the tests. The filters were made of polyamide, polytetrafluorethylen, polycarbonate material and material created from esters of cellulose. In the end only one membrane filter was chosen, that had the most optimal properties for the next measurements – optimally prolonged the liberation of TTC from the carrier, so that differences in tested materials were clearly visible, but otherwise the liberation profile didn't influence that much.

Finally, the obtained liberation profiles were evaluated and compared. The main monitored parameters were the release rate of TTC from the nanofiber carrier and the final values of the released TTC, which were achieved under the different measurement conditions.

# OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	3
1. Úvod.....	4
2. Cíl a popis zadání práce.....	5
3. Teoretická část.....	6
3.1. Neseparační průtokové metody.....	6
3.2. Sekvenční injekční analýza.....	7
3.1.1. Princip metody.....	7
3.2.2. Přístrojové vybavení SIA.....	9
3.2.3. Možnosti využití SIA systému.....	10
3.3. Nanovlákná.....	11
3.3.1. Typy nanovláken.....	11
3.3.2. Příprava nanovláken.....	12
3.3.3. Využití nanovláken.....	20
3.4. Modifikace povrchu nanovláken.....	21
3.5. Tetracyklin.....	22
4. Experimentální část.....	24
4.1. Použité přístroje a pomůcky.....	24
4.2. Použité chemikálie.....	25
4.3. Příprava roztoků.....	25
4.4. Testované vzorky.....	27
4.5. Parametry stanovení TTC v SIA systému.....	27
4.6. Vývoj analytické metody.....	29
4.7. Kalibrační rozmezí pro stanovení TTC v SIA systému.....	29
4.8. Postup měření pro monitorování liberačního profilu.....	29
5. Výsledky a diskuze.....	32
5.1. Kalibrace pro stanovení tetracyklinu.....	32
5.1.1. Kalibrační křivka pro tlumivý roztok o pH 7,4.....	32
5.1.2. Kalibrační křivka pro tlumivý roztok o pH 4,5.....	34
5.2. Liberace TTC.....	35
5.2.1. Liberace z T-A nanovláken při pH 7,4 a teplotě 32°C.....	36
5.2.2. Liberace z T-AK nanovláken při pH 7,4 a teplotě 32°C.....	40



5.2.3. Porovnání liberace z T-A a T-AK nanovláken při pH 4,5 a teplotě 32°C....	41
5.2.4. Porovnání liberace z T-A a T-AK nanovláken při pH 4,5 a teplotě 37°C....	42
5.2.5. Porovnání liberace z T-A nanovláken při různém pH.....	43
5.2.6. Porovnání liberace z T-AK nanovláken při různém pH.....	44
5.2.7. Porovnání liberace z T-A nanovláken při různé teplotě.....	45
5.2.8. Porovnání liberace z T-AK nanovláken při různé teplotě.....	46
6. Závěr.....	47
7. Literatura.....	48
8. Přílohy.....	52
8.1. Příloha č.1 – Program pro kalibraci.....	52
8.2. Příloha č.2 – Program pro liberaci – 1 cela.....	53

## Seznam použitých zkratk

APTES	(3-aminopropyl)triethoxysilan
CFA	Kontinuální průtoková analýza
DCSBD	Difúzní koplanární povrchový bariérový výboj
DMF	Dimethylformamid
FIA	Průtoková injekční analýza
LOV	Lab-On-Valve
MPV	Vícecestný selekční ventil
PA	Polyamid
PAI	Polyamidimid
PAN	Polyakrylonitril
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUR	Polyuretan
PVA	Polyvinylalkohol
PVAc	Polyvinylacetát
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SFA	Segmentovaná průtoková analýza
SIA	Sekvenční injekční analýza
T-A	Tetracyklin navázaný na nanovlákná typu A
T-AK	Tetracyklin navázaný na nanovlákná typu AK
TEOS	Tetraethoxysilan
TMOS	Tetramethoxysilan
TTC	Tetracyklin
UV-VIS	Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra

# 1. Úvod

Průtokové techniky představují analytické metody, pro něž je charakteristická především rychlost analytického procesu a možnost automatizace (sériové analýzy). U těchto metod je obecně eliminována fáze odměřování objemu vzorku (pipetování), jsou zpracovávány velmi malé objemy a manipulace s jednotlivými roztoky probíhá v uzavřeném průtokovém systému [1].

Sekvenční injekční analýza (SIA), jedna z moderních neseparačních průtokových technik, vznikla odvozením od průtokové injekční analýzy (FIA). Jedná se o první analytickou metodu založenou na programování toku [2].

Využití této metody je časté například v oblasti výzkumu, a to především pro její snadnou a rychlou optimalizaci, možnosti sledování reakční kinetiky a programovatelné úpravy reakčních podmínek [3].

Nanovláknenné membrány patří v současnosti mezi intenzivně studované, aplikačně velmi rychle se rozvíjející materiály. Jejich vlákna jsou charakterizována dvěma dimenzemi v řádu desítek až stovek nanometrů. Díky obrovskému povrchu, vysoké porozitě a dalším výhodným vlastnostem našly využití v řadě technických odvětví. Jejich využití v oblasti medicíny a farmacie například jako nosičů léčiv, krytí ran či podkladů pro kultivaci buněk je v současnosti velmi aktuálním tématem [4].

V praxi lze využívat nanovláknena anorganické i organické povahy, kdy se pro jejich přípravu volí především anorganické oxidy kovů nebo organické polymery [5].

## 2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit způsob liberace tetracyklinu (TTC) z nanovláken, jakožto vybrané biologicky aktivní látky, při automatizovaném měření v SIA systému a za využívání různých podmínek. Množství TTC bylo navázané na konkrétním nanovláčenném nosiči anorganické povahy. Byly využívány dva typy těchto nanovláčenných nosičů - pro diplomovou práci pojmenovány jako „A“ a „AK“, přičemž rozdíl mezi nimi spočíval v odlišném postupu jejich přípravy a odtud plynoucí různé povrchové úpravy. Typ „AK“ vznikl kombinací dvou různých způsobů funkcionalizace povrchu nanovláken „A“ a „K“. Měření s nanovláčny typu „K“ nebyla v této práci realizována kvůli příliš nízkým hladinám navázaného TTC. TTC byl na vytvořené nosiče nanesen jejich ponořením do ethanolického roztoku TTC po dobu dvou hodin. Veškerá měření pro tuto diplomovou práci probíhala ve spolupráci s Technickou univerzitou v Liberci, která tyto vzorky připravovala a poskytovala.

Předpokladem bylo, že vzorky typu T-AK (tetracyklin navázaný na nanovláčenný nosič AK) budou, na rozdíl od T-A (tetracyklin navázaný na nanovláčenný nosič A), při měřeních vykazovat významnější vazbu pro TTC, jak z hlediska množství, tak z hlediska síly této vazby. Následkem toho by mělo docházet k prodloužení celkové doby liberace, k získání vyšších naměřených hodnot uvolněného TTC a následně k jejich plynulejšímu poklesu, než u vzorku s nanovláčny typu A. Pro ověření výsledků byly mezi sebou získané liberační profily, odpovídající různým podmínkám měření, vzájemně porovnávány.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Neseparační průtokové metody

Průtokové metody jsou kinetické metody analýzy založené na měření v proudě nosné kapaliny [6]. Charakteristickými rysy jsou především rychlá a přesná analýza, miniaturizace aparatury, automatická příprava vzorků a jednoduchá manipulace s analyty. Velkou výhodou je také minimální spotřeba vzorků, činidel i vzniklého odpadu a minimalizace rizika zanesení chyby lidským faktorem.

Do této skupiny spadají jednak starší metody, jako je kontinuální průtoková analýza (CFA) nebo segmentovaná průtoková analýza (SFA), a pak také již modernější průtoková injekční analýza (FIA), její nástupce sekvenční injekční analýza (SIA) a Lab-On-Valve metoda představující modifikaci SIA systému směřující k další miniaturizaci.

Tabulka 1: Hlavní charakteristiky průtokových neseparačních metod [7,8,9]

Typ systému	Charakteristika	Výhody a nevýhody
CFA – Kontinuální průtoková analýza	Kontinuální dávkování nosného proudu (často s činidlem) a vzorku do průtokového systému; průběh chemické reakce až do doby dosažení rovnovážného stavu	Vysoká spotřeba reagensů, dlouhá doba trvání analýzy
SFA – Segmentovaná průtoková analýza	Vzorky dávkované do systému odděleny vzduchovými bublinami; průběh chemické reakce až do doby dosažení rovnovážného stavu	Vysoká spotřeba reagensů, dlouhá doba trvání analýzy  Eliminace mísení jednotlivých vzorků
FIA – Průtoková injekční analýza	Kontinuální dávkování pouze nosného proudu a činidla, vzorky dávkovány do nosného proudu injekčním ventilem; kontrolovaná disperze	Jednosměrný tok a pulzování toku; nižší mechanická odolnost elastických hadiček  Zrychlení analýzy a nižší

		spotřeba reagensií; jednoduché vybavení
SIA – Sekvenční injekční analýza	Zavedení pístového čerpadla a umožnění obousměrného toku nosného proudu; využívání vícecestného selekčního ventilu; celý systém řízen počítačem	Dokonalejší promísení aspirovaných zón, nízká spotřeba reagensií, vysoká rychlost analýzy
LOV SIA – Lab-On-Valve modifikace SIA	Miniaturizace systému SIA, hadičky nahrazeny úzkými kanálky; realizace analýzy na malé ploše selekčního ventilu s plastovým modulem	Zmenšení všech částí systému a velmi nízká spotřeba reagensií, měření přímo LOV modulu

### ***3.2. Sekvenční injekční analýza***

Tato analytická metoda, vyvinutá jako další generace neseparačních průtokových metod, vznikla na počátku devadesátých let díky skupině analytiků z University of Washington pod vedením českého vědce prof. Růžičky [6]. Odstranění nedostatků FIA a spojení s dalšími výhodnými vlastnostmi z ní učinilo velmi praktickou, rychlou a téměř univerzální neseparační analytickou techniku [7].

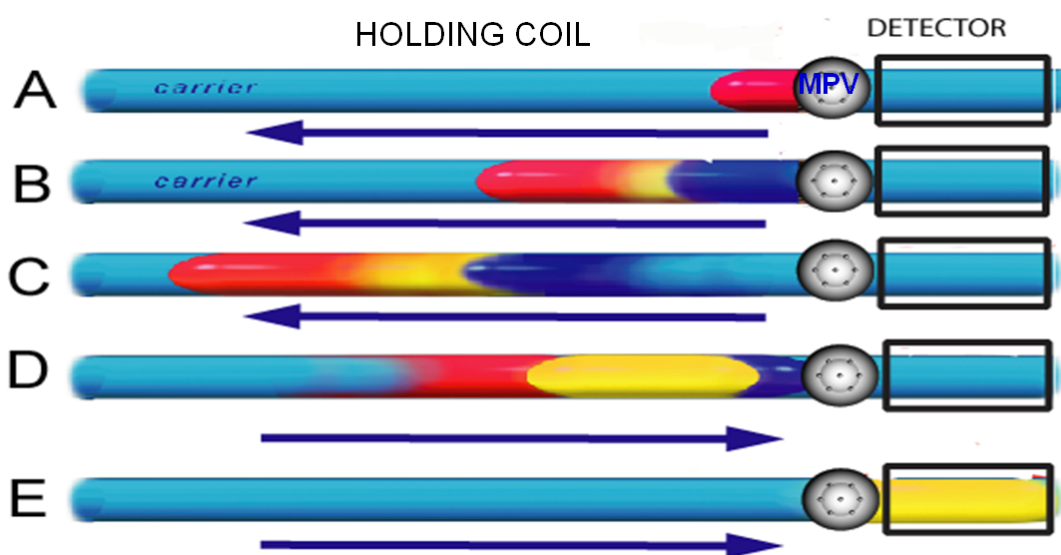
#### ***3.1.1. Princip metody***

Metoda byla vyvinuta během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy (FIA) [6]. FIA pracuje s kontinuálním tokem, zatímco SIA umožňuje tok programovat a optimálně přizpůsobit jednotlivé kroky měření [10]. Základem je převést vybraný analyt, obsažený ve vzorku, pomocí reakce s činidlem, na detekovatelný produkt [6].

SIA využívá oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně aspirovány do jednokanálového systému s využitím vícecestného (6, 8, 10-cestného) selekčního ventilu a pístového čerpadla. Poté dochází k obrácení

pohybu pístu a změně směru toku nosného proudu (i několikrát), čímž se dokonale promísí zóny vzorku a činidla. Vzniká produkt, který je následně dopraven do detektoru [6]. V něm dochází k detekci signálu získaného produktu. Tento signál, ve tvaru píku, je dále registrován počítačem s konkrétním ovládacím programem, který získaná data vyhodnocuje a mimo to také umožňuje libovolně měnit parametry analýzy bez nutnosti změn v sestavení přístroje.

Princip systému popisuje obrázek 1.



Obrázek 1 – Princip SIA (změna toku) [2]

(*holding coil – mísící cívka; MPV – vícecestný selekční ventil; detector – detektor; carrier – nosný proud; červená – vzorek; žlutá – produkt; modrá – činidlo*)

A – nástřik vzorku do mísící cívky

B – aspirace činidla

C - vzájemné promíchávání vzorku a činidla za postupné tvorby produktu

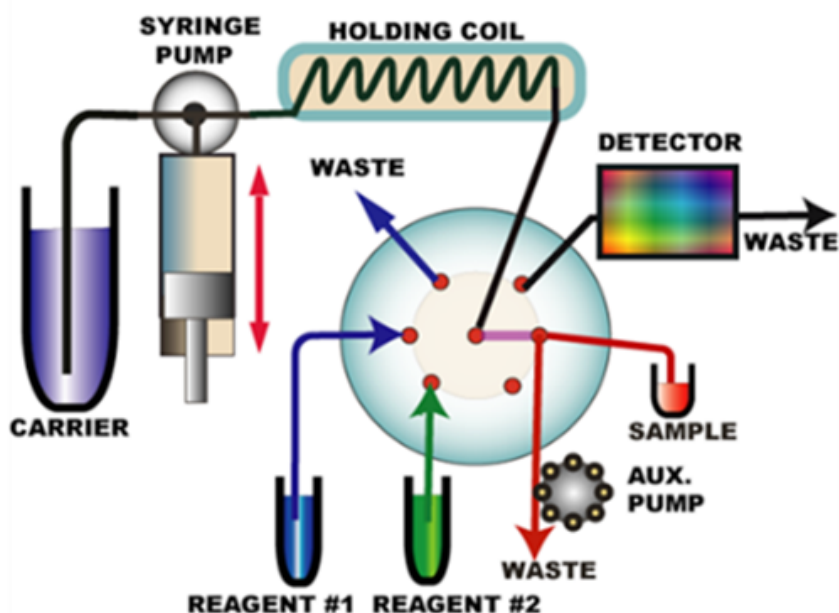
D – změna směru toku a další promíchávání reagentů

E – detekce signálu vzniklého produktu v detektoru

### 3.2.2. Přístrojové vybavení SIA

Systém je tvořen jednokanálovým dvousměrným pístovým čerpadlem, které umožňuje měnit směr toku nosného proudu, vícecestným selekčním ventilem pro aspiraci reagensů (nejčastěji 6, 8 nebo 10-cestný) a mísící cívkou, která kromě promíchávání, slouží také jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do čerpadla. Dále je součástí systému spojovací materiál (obvykle jsou používány plastové hadičky s vnitřním průměrem 0,7-0,8 mm) a vhodný detektor [2]. Typy detektorů využívaných v SIA systému jsou nejčastěji UV/VIS spektrofotometrický, fluorescenční, chemiluminiscenční nebo elektrochemický [11]. Výběr způsobu detekce závisí na konkrétním stanovovaném analytu a reakci probíhající při daném měření.

Celý systém je řízen počítačem s vhodným ovládacím programem, který registruje signál vyhodnocený detektorem a díky kterému není nutné v případě potřeby přestavovat systém, jako tomu bylo u starších metod. Jednotlivé součásti systému jsou znázorněny na obrázku 2.



Obrázek 2 – Schéma SIA systému [2]

(*carrier* – nosný proud; *syringe pump* – pístové čerpadlo; *holding coil* – mísící cívka; *waste* – odpad, *detector* – detektor; *sample* – vzorek; *reagent* – činidlo; *aux. pump* – pomocné čerpadlo)



### **3.2.3. Možnosti využití SIA systému**

Tato analytická technika nachází uplatnění v mnoha odvětvích, jako je monitorování kvality životního prostředí, farmacie, potravinářství, biotechnologie, radiochemie a metalurgie, kinetické studie chemických reakcí nebo monitoring v oblasti průmyslu [12]. Její uplatnění je ale spíše výzkumné, rutinní využití zatím umožňují technické normy v analýze vzorků životního prostředí.

Ve farmacii své využití nachází při hodnocení kvality a účinnosti léčiv, při stanovování obsahu účinné látky v substancích, lékových formách a biologických materiálech. V oblasti technologické ke zjišťování stejnoměrnosti obsahu účinné látky nebo k monitorování disolučního procesu pevných lékových forem [3]. Významná je také možnost použití SIA systému při studiu vazby léčiv či toxických látek na krevní bílkoviny [6].

V oblasti životního prostředí lze tuto analytickou metodu využít například pro stanovení anorganických iontů ve vodě různého původu, kdy lze s výhodou stanovit několik iontů zároveň. Dále pro stanovení obsahu herbicidů či pro zjištění množství těžkých kovů [6]. V potravinářství může být využita k analýze potravin (maso, ovoce a zelenina atd.) a alkoholických i nealkoholických nápojů (pivo, víno, mléko atd.) [9].

Poměrně často se v SIA uplatňují také imunoanalytické reakce, kdy je možno za využití speciálních detekčních cel immobilizovat protilátky nebo antigeny přímo v SIA systému. Tento způsob byl využit například při stanovení imunoglobulinu G [6].

### **3.3. Nanovlákna**

Nanovlákna se vyznačují průměrem menším než 1 mikrometr (desítky až stovky nanometrů) a jejich délka je zpravidla o dva a více řádů vyšší. V praxi se téměř nikdy nevyskytují samostatně, ale jsou uspořádána do vyšších strukturně prostorových celků, se kterými lze reálně manipulovat [13]. Jsou tvořena různými typy organických i anorganických látek, což zapříčiňuje jejich rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti. Jedny z hlavních výhodných charakteristik nanovláken jsou velký specifický povrch a vysoká porozita s malou velikostí pórů.

Jelikož je průměr nanovláken menší, než je vlnová délka viditelného světla (tzn. 400 – 750 nm) nejsme schopni je sledovat pod běžným mikroskopem, a proto jsou pro jejich pozorování využívány mikroskopy elektronové [14].

#### **3.3.1. Typy nanovláken**

- Lineární – jedná se o nitě a příze s velmi dobrými mechanickými vlastnostmi (využití například při výrobě neprůstřelných vest). Nezařazují se zde však útvary vyrobené na bázi nití s nánosem nanovláken [13].
- Plošné (ve vrstvách) – vyskytují se dva základní typy těchto vrstev – netkané textilní útvary a tkané textilní útvary. Netkaný typ má nanovlákna přes sebe nahodile rozházena, zatímco tkaný typ je tvořen vlákny organizovanými do vyššího uspořádání. Jejich využití je například při krytí ran či filtracích. Společným znakem je, že vlákna jsou pokládána přes sebe a vytvářejí rovinu, ze které nevystupují [13].
- Objemné útvary, vaty – jedná se o obdobu předchozího typu, ale s tím rozdílem, že zde nanovlákna již vystupují do třetího rozměru a útvary připomínají objemnou vatu různé hustoty. Využití nacházejí v oblasti tkáňového inženýrství [13].

### **3.3.2. Příprava nanovláken**

Pro přípravu nanovláken je v současnosti využíváno mnoho různých anorganických i organických látek. Ze skupiny anorganických sloučenin se jedná především o oxidy kovů, například  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Li}_4\text{Ti}_5\text{O}_{12}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ . Ze zástupců látek organických jsou často využívány polymery jako je například polyvinylalkohol (PVA), polyuretan (PUR), polyamidimid (PAI), polyakrylonitril (PAN), polyvinylpyrrolidon (PVP) a další [5].

Existuje několik možností přípravy nanovláken, mezi které řadíme například elektrostatické zvláknování (tzv. elektrospinning), foukání taveniny, dloužení, použití šablon či fázovou separaci. Z těchto metod je nejčastěji využíváno elektrostatické zvláknování, jehož výhodou jsou především nízké náklady a rychlost výroby nanovláken [13].

#### **Příprava anorganických nanovláken**

První část přípravy anorganických nanovláken je založena na vzniku polymerního roztoku sol-gel metodou, poté následuje metoda elektrostatického zvláknování a celý proces je zakončen kalcinací.

Shrnutí:

1. Příprava roztoku (sol) za využití anorganického prekurzoru.
2. Smíchání anorganického roztoku s „pomocným“ polymerem pro získání roztoku vhodné viskozity.
3. Elektrostatické zvláknování roztoku pro vytvoření vláken obsahujících anorganický prekurzor a polymer.
4. Kalcinace vláken za zvýšené teploty [15].

#### **Sol-gel metoda**

Jedná se o přípravu silikátových a příbuzných materiálů, jejichž společným znakem je homogenizace výchozích složek ve formě roztoku, jejich převod na roztok a následně, při využití některých chemických reakcí (hydrolýza, polykondenzace), na gel při zachování homogenity [16].

Podle výchozích surovin lze postupy rozdělit na dvě skupiny:

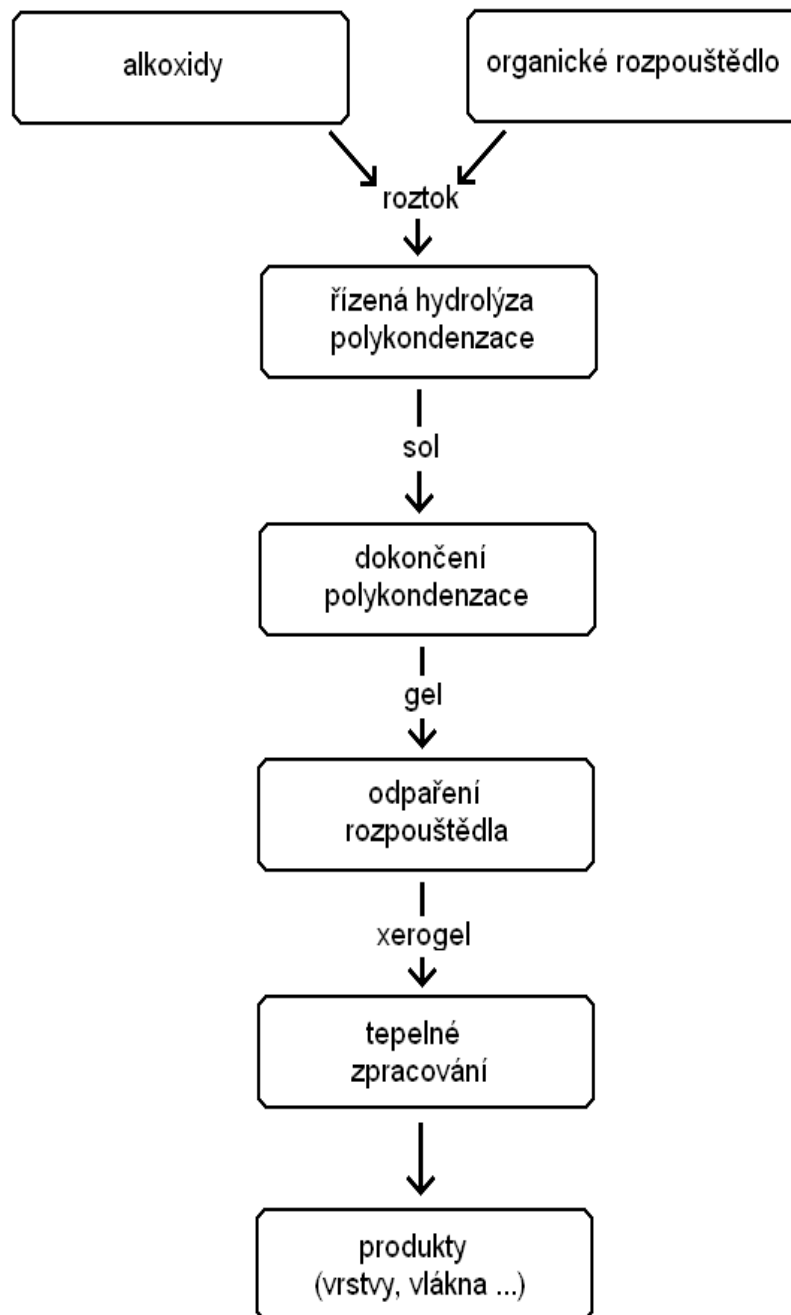
- Postupy vycházející z alkoxidů
- Postupy vycházející z roztoku oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2$ ) a jiných roztoků oxidů [16]

Jako anorganické prekurzory, pro přípravu polymerního roztoku, se nejčastěji využívají alkoxidy kovů pro jejich snadnou reakci s vodou (tetramethoxysilan (TMOS) či tetraethoxysilan (TEOS)) nebo alkoxytitanáty (tetra-n-butylorthotitanát) [17].

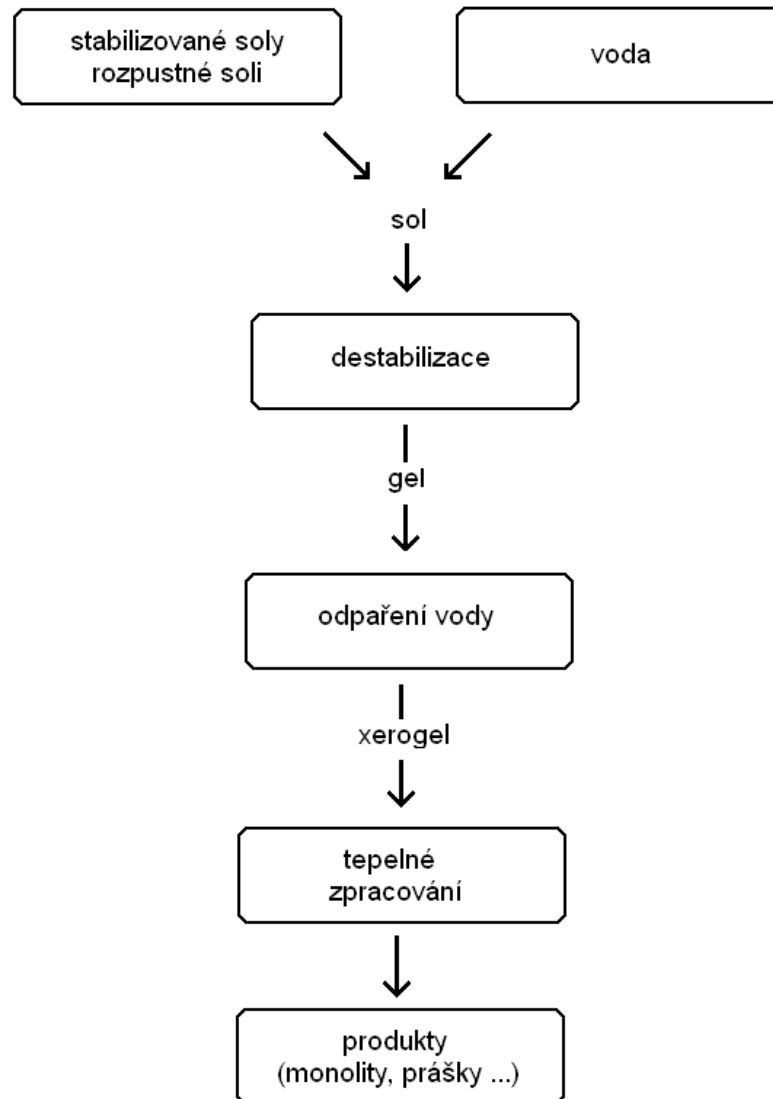
Mezi nepoužívanější pomocné polymery patří díky dobré rozpustnosti ve vodě a kompatibilitě s mnoha solemi polyvinylalkohol (PVA), dále je možno použít polyvinylacetát (PVAc), polyvinylpyrrolidon (PVP) nebo polyakrylonitril (PAN) [18]. Funkcí tohoto polymeru v roztoku je, že při kalcinaci, jakožto finální úpravě nanovláken, zajišťuje spojování nanočástic a vznik krystalické struktury [5].

Kromě anorganického prekurzoru a polymeru je pro tvorbu roztoku nutno použít také vhodné organické rozpouštědlo, například ethanol, vodu, isopropylalkohol, chloroform, dimethylformamid (DFM) nebo jejich směsi [18].

Schéma přípravy:



Obrázek 8 - Princip sol-gel metody vycházející z alkoxydů [19]



Obrázek 9 - Princip sol-gel metody vycházející ze stabilizovaných roztoků [19]

Mezi výhody této metody patří vysoká homogenita a čistota produktů, malá energetická náročnost či možnost přípravy speciálních kompozitních materiálů. Naopak nevýhodami tohoto procesu je vysoká cena vstupních surovin, vyšší technologická náročnost nebo zbytky uhlíku a OH skupin v materiálech [19].

### ***Elektrostatické zvlákňování***

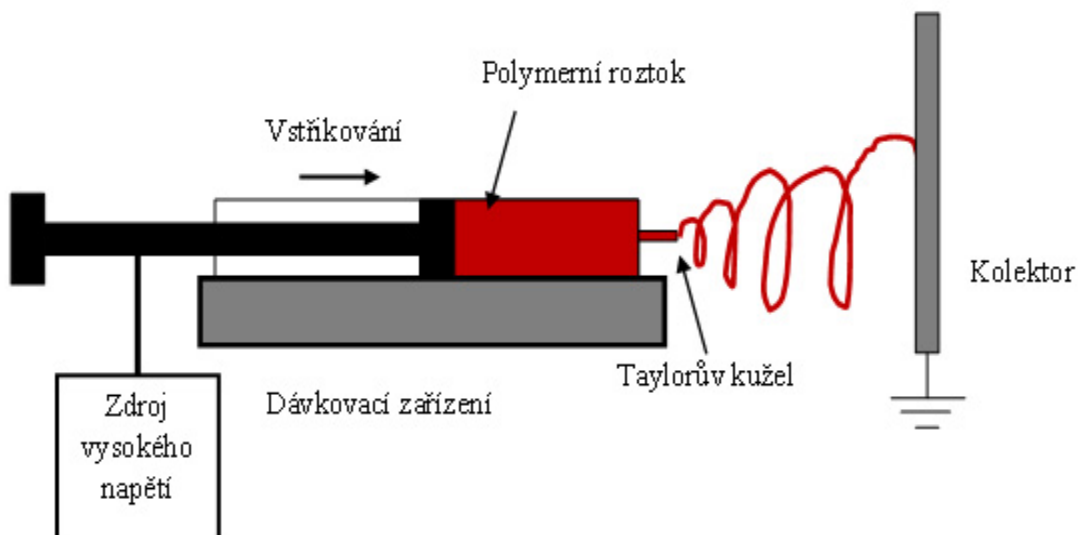
Tuto metodu lze používat v několika různých obměnách. Nejrozšířenější je jehlové/kapilární zvlákňování a bezjehlové zvlákňování, přičemž oba způsoby využívají vysokonapěťových zdrojů stejnosměrného proudu [20].

- Jehlové/kapilární – zvlákňování z roztoku polymeru nebo taveniny, které je založeno na tvorbě jediné polymerní trysky z kapiláry [20].
- Bezjehlové – založeno na zvlákňování z volných povrchů kapalin, kdy se využívá destabilizace volných hladin roztoků polymerů vlivem vnějšího elektrického pole [20].

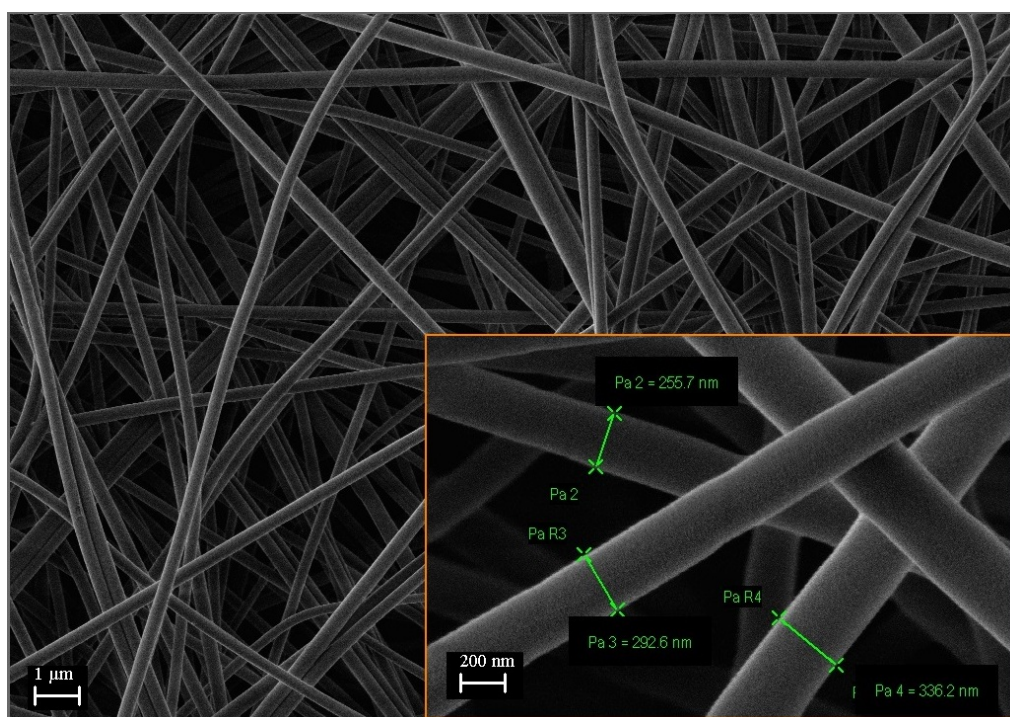
U elektrostatického zvlákňování z jehly se jedná o přípravu z polymerního roztoku nebo polymerní taveniny za využití elektrostatických a kapilárních sil. Při tomto procesu dochází ke vzniku elektricky nabitého proudu roztoku polymeru nebo taveniny, k jehož vytvoření je využíváno vysoké napětí. Zdroj napětí je spojen přímo s polymerním roztokem a protielektroda (kolektor) je uzemněna.

Zvyšováním síly elektrického pole se kapka roztoku na špičce kapiláry (jehly) prodlužuje a tvoří se kónický tvar známý jako Taylorův kužel. Když elektrické pole dosáhne tzv. kritické hodnoty, při které odpudivé elektrické síly převýší velikost povrchového napětí, nabitý proud polymeru z hrotu Taylorova kužele vystřelí směrem k protější elektrodě [21]. V případě zvlákňování z roztoku polymeru dochází při letu k odpaření rozpouštědla a vzniklé nanovlákně se následně na opačně nabitě elektrodě náhodně přichytává.

Alternativní metodou pro přípravu nanovláken je elektrostatické zvlákňování z taveniny polymeru, kdy se nevyužívají žádná rozpouštědla [22]. Polymer je v trysce zahříván, aby nedocházelo k jeho nechtěnému tuhnutí a následně, při letu ke kolektoru, je jeho proud ochlazován a vznikají vlákna. Vlákna vytvořená touto metodou dosahují větších průměrů než ta, která vznikla z roztoku polymeru.



Obrázek 10 – Princip elektrostatického zvlákňování [23]



Obrázek 11 – Nanovláknna vytvořená metodou elektrosponingu [23]

### **NanoSpider™**

Tato technologie se řadí mezi bezjehlové metody zvlákňování a jedná se o modifikaci elektrosponingu. Byla vynalezena v roce 2003 výzkumným týmem profesora Oldřicha Jirsáka na Katedře netkaných textilií Technické univerzity v Liberci,

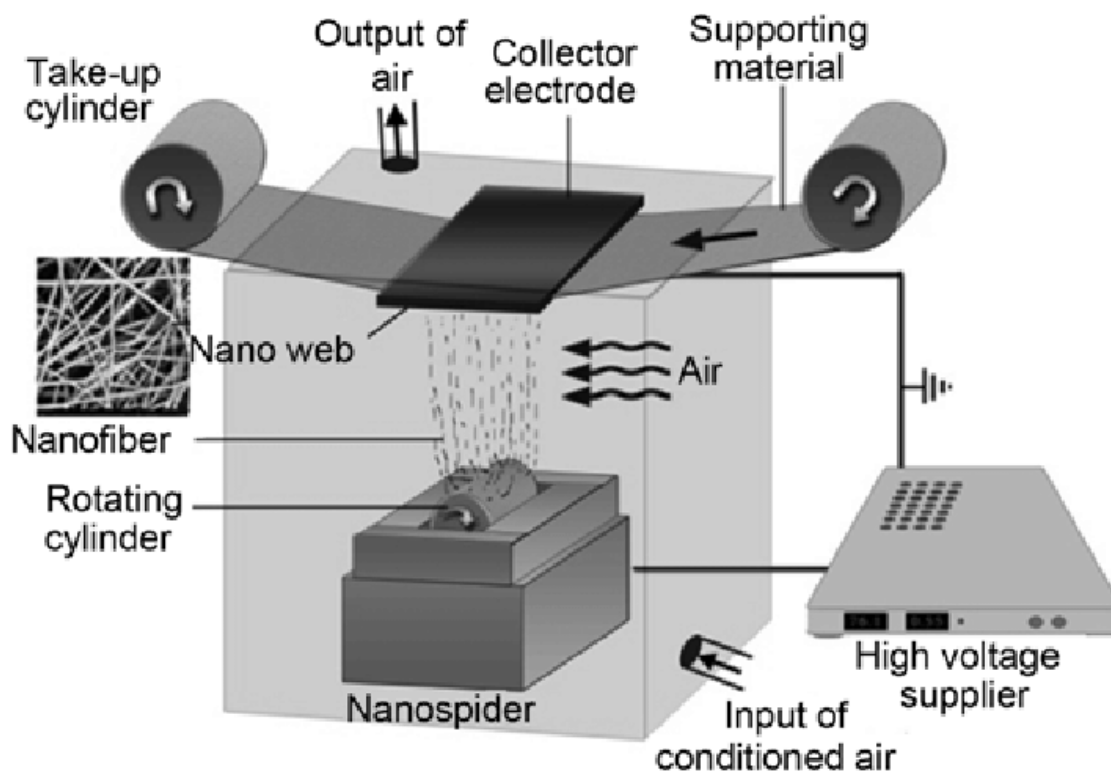


kde byla také patentována jako US Patent 7,585,437 B2 [24]. Jejím předním výrobcem je česká společnost Elmarco s.r.o. působící na trhu od roku 2004.

Principem této metody je zvlákňování z volné hladiny roztoku polymeru v silném elektrostatickém poli vytvářeném dvěma elektrodami [25]. Spodní (kladná) elektroda má podobu rotujícího válce a je z části ponořena do roztoku polymeru. Na povrchu tohoto válce, otáčejícího se neustále kolem své osy, se vytváří tenká vrstva roztoku polymeru. V horní části rotačního válce, kde je maximální intenzita elektrického pole, vzniká množství Taylorových kuželů a z jejich vrcholů následně dochází k procesu zvlákňování. Vlákna, po dopadu na nosnou fólii umístěnou pod druhou (zápornou) elektrodou a po odpaření rozpouštědel, ztuhnou a dochází k tvorbě pevných struktur [14]. Výsledkem je látka použitelná pro nejrůznější druhy výrobků [26].



Obrázek 12 – Nánovlákná vznikající technologií NanoSpider™ [26]



Obrázek 13 – Princip technologie NanoSpider™ [27]

*(take-up cylinder – navíjecí válec; output of air – odchod vzduchu; collector electrode – kolektor; supporting material – podkladový materiál; nanofiber – nanovláknko; nano web – síť nanovláken; air – vzduch; rotating cylinder – rotující válec; high voltage supplier – zdroj vysokého napětí; nanospider – technologie nanospider; input of conditioned air – přístup vzduchu)*

### **Kalcinace**

V této poslední fázi přípravy se nanovláknka po dobu několika hodin vystavují vysokým teplotám (300-950°C) – tzv. tepelná kalcinace. Pro každý typ nanovláknka je nutno specifikovat konkrétní podmínky, za kterých bude kalcinace probíhat. Výsledkem kalcinace je odstranění organické složky a vznik konečné formy nanovláken. Tato metoda je ale finančně, časově i energeticky náročná [5].

Ekonomičtější alternativou tepelné kalcinace by mohla být kalcinace za využití plazmatu o vhodných vlastnostech, aby byly splněny požadavky jednoduchého, levnějšího a časově méně náročného procesu. Vhodným se jeví tzv. Difúzní koplánární

povrchový bariérový výboj (DCSBD), který hoří za atmosférického tlaku a v jakémkoliv plynu, včetně vzduchu [5].

### ***Parametry ovlivňující proces tvorby nanovláken***

Důležitými parametry, které mohou mít významný vliv na konečný vzhled nanovláken, jsou jednak vlastnosti polymeru, konkrétně jeho typ, molekulární hmotnost a koncentrace, pak také vlastnosti roztoku, jako je viskozita, elasticita nebo povrchové napětí. Důležitým je také hydrostatický tlak v trysce a její vzdálenost od kolektoru. Mezi sledovanými parametry okolí je významná relativní vlhkost, teplota a rychlost proudění vzduchu v komoře přístroje.

Jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících průměr vzniklých nanovláken je právě viskozita roztoku. Čím je viskozita vyšší, tím je průměr nanovláken větší. Viskozita je přímo úměrná koncentraci polymeru rozpuštěného v rozpouštědle. Dalším parametrem, který ovlivňuje konečný průměr vláken je elektrické napětí – čím vyšší je toto napětí, tím větší bude průměr vzniklých nanovláken [28, 29].

### ***3.3.3. Využití nanovláken***

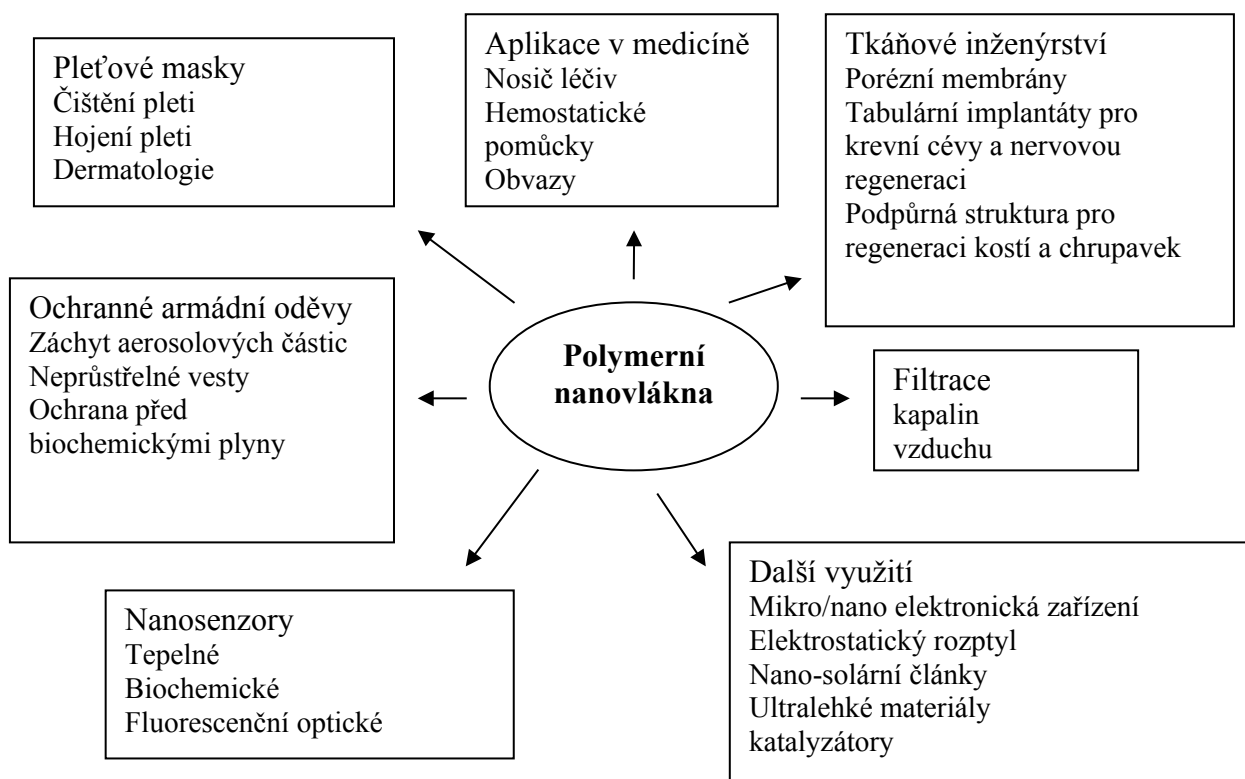
Nanovlákná, jakožto materiály s obrovským potenciálem, nacházejí uplatnění v množství oborů a jejich využití stále narůstá. Jsou hojně používána například v medicíně, stavebnictví, textilním, automobilovém či leteckém průmyslu nebo také v oblasti vojenské.

V oblasti medicíny se uplatňují například při výrobě náplastí s obsahem léčivých látek, obvazových materiálů a pak také jako bariérové materiály (filtry s antibakteriálními účinky) pro ochranu před infekcemi či prosáknutím tělních tekutin. Nadějnou se stává také možnost jejich uplatnění jako materiálů pro tvorbu umělých cév [14, 26].

V oděvním průmyslu je lze využívat pro tvorbu membrán používaných do různých druhů obuvi nebo outdoorového oblečení, pro jejich vysokou schopnost ochrany před větrem a odvádění potu [26].

Díky jejich výhodným vlastnostem, jako jsou velmi malé průměry vláken a pórů, mají velký význam při výrobě filtračních materiálů také v jiných oblastech než je zdravotnictví, a to jednak v průmyslu, například pro filtraci vzduchu či kapalin nebo také v potravinářství a domácnostech [14]. V neposlední řadě jsou hojně využívány při

výrobě kosmetiky nebo v oblasti vojenské při výrobě ochranných pomůcek. Shrnutí zobrazeno na obrázku 14.



Obrázek 14 - Možnosti využití nanovláken [28]

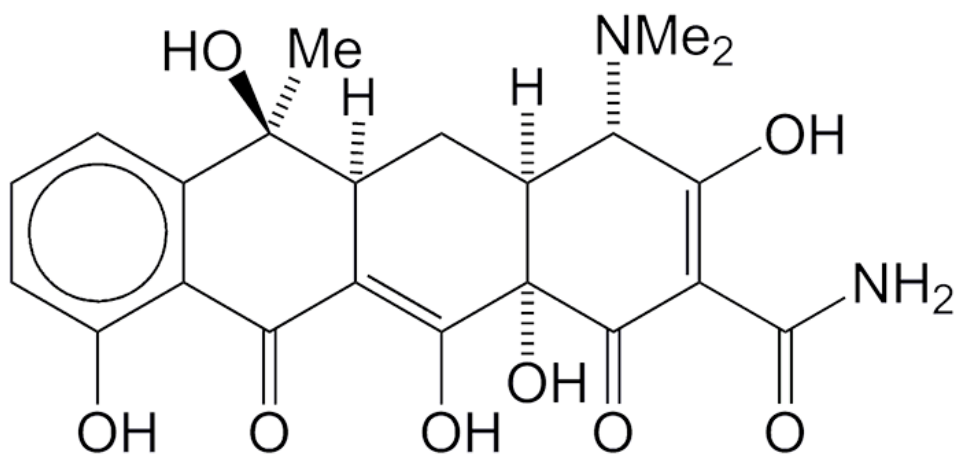
### 3.4. Modifikace povrchu nanovláken

Jestliže chceme na povrch vzniklých nanovláken imobilizovat některé další molekuly (antibiotika, enzymy atd.), je často zapotřebí modifikovat jejich povrch. K tomuto účelu lze využít metodu silanizace, která na povrch vnáší specifické funkční skupiny schopné další interakce s reaktivními skupinami imobilizované aktivní molekuly. Pro proces silanizace je nutná přítomnost -OH skupin na nanovláčkách, kdy jejich prostřednictvím dochází k navázání silanů - tzv. silanizačních činidel.

Mezi nejpoužívanější patří (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES), (3-aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) nebo (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (GPS) [30]. Po navázání vzniká vazba Si-O-Si. Všechna silanizační činidla obsahují ve své molekule reaktivní funkční skupinu (například -NH<sub>2</sub> skupina v molekule APTES), na kterou mohou být následně imobilizovány zvolené látky.



jako profylaxe novorozenecké gonokokové konjunktivitidy). Dále se využívá při léčbě rosacey a pro podporu hojení lézí různých kožních onemocnění [32].



Obrázek 16 - Vzorec Tetracyklinu [33]

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité přístroje a pomůcky

- SIA systém
  - MicroSIA systém, FIALab Instruments, Bellevue, USA
  - šesticestný selekční ventil + 5 ml pístové čerpadlo
  - UV-VIS spektrofotometr Ocean Optics USB 4000, USA
  - peristaltické pružné hadičky (materiál PTFE, průměr 0,75 mm)
  - FIALab software for Windows 5.0, verze 5.9.321, FIALab Instruments, Bellevue, USA
  - peristaltické čerpadlo
- membránové filtry – viz. tabulka 2
- Franzovy difúzní cely (15 ml)
- vodní lázeň
- termostat Julabo, Německo
- magnetická míchačka POLY 15 Variomag, H+P Labortechnik AG, Německo

Tabulka 2: Testované membránové filtry

Označení	Materiál	Velikost pórů ( $\mu\text{m}$ )	Vlastnosti
PA	Polyamid	0,45	hydrofilní
PTFE	Polytetrafluorethylen	0,45	hydrofilní
HAWP	Estery celulózy	0,45	hydrofilní
HTTP	Polykarbonát	0,40	hydrofilní

## **4.2. Použité chemikálie**

Tetracyklin hydrochlorid (TTC) – Sigma, Praha, Česká republika

Ultračistá voda – připravená pomocí přístroje Millipore, Merck, Praha, ČR

Methanol – pro kapalinovou chromatografii – Sigma, Praha, Česká republika

Hydroxid sodný p.a. – Penta, Praha, Česká republika

Dihydrogenfosforečnan draselný (0,2 mol/l) – Sigma, Praha, Česká republika

Octan sodný – Sigma, Praha, Česká republika

Kyselina octová (2 mol/l) – Penta, Praha, Česká republika

## **4.3. Příprava roztoků**

Před každým měřením byl za použití tlumivého roztoku připraven zásobní roztok TTC (koncentrace 1mg/ml) a z něj poté řada standardních roztoků pro proměření kalibrační křivky.

### ***Příprava tlumivého roztoku o pH 7,4***

Tento roztok byl připraven odměřením 393,4 ml hydroxidu sodného 0,1 mol/l, ke kterému bylo přidáno 250 ml dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l a vše následně promícháno.

### ***Příprava tlumivého roztoku o pH 4,5***

Pro jeho přípravu bylo naváženo 1,495 g octanu sodného, který byl rozpuštěn v 7 ml roztoku kyseliny octové (2 mol/l) a nakonec vše zředěno ultračistou vodou na 500 ml.

### ***Příprava zásobního roztoku TTC***

Zásobní roztok byl připraven navážením 2 mg TTC do skleněné vialky a jeho rozpuštěním ve 2 ml toho tlumivého roztoku, který byl aktuálně používán pro liberaci. Tento zásobní roztok měl výslednou koncentraci 1 mg/ml a byl připravován v každý den měření čerstvý.



### ***Příprava standardních roztoků TTC***

Před prvním měřením, pro proměření kalibrační křivky, byly ze zásobního roztoku připraveny vlastní standardní roztoky o koncentracích 1, 5, 10, 15, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  do 5 ml odměrných baněk. Ze zásobního roztoku byl pokaždé odebrán potřebný objem do odměrné baňky a ta následně doplněna po rysku stejným tlumivým roztokem, který byl použit při přípravě zásobního roztoku TTC (tabulka 3).

Po vyhodnocení kalibrační křivky byly při dalších měřeních pro kontrolu linearitity používány již jen standardní roztoky o koncentracích 5, 10 a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

*Tabulka 3: Příprava standardních roztoků*

<b><i>Koncentrace standardu (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i></b>	<b><i>Množství zásobního roztoku (<math>\mu\text{l}</math>)</i></b>
1	5
5	25
10	50
15	75
25	125
50	250

#### ***4.4. Testované vzorky***

Vzorky ve formě nanovlákných membrán s obsahem TTC byly dodávány Technickou univerzitou v Liberci, která je připravovala za využití technologie NanoSpider™.

V této diplomové práci byly pro měření využívány dva typy vzorků – T-AK a T-A. Základ tvořila anorganická křemičitá nanovlákná, vytvářená elektrostatickým zvlákňováním polymerního roztoku. Tento roztok byl připraven sol-gel metodou za využití alkoxyasilanu tetraetylésteru kyseliny křemičité (TEOS), jako jeho prekurzoru. Princip sol-gel metody i následného elektrostatického zvlákňování, použitého pro vznik samotných nanovláken, je detailně rozepsán v kapitole 3.3.2.

Vytvořená nanovlákná byla, po očištění svého povrchu, aktivována metodou silanizace, za pomoci silanizačního činidla (3-aminopropyl)triethoxysilanu (APTES). Tato forma aktivace byla použita pouze pro nanovlákná typu „AK“. Druhý typ nanovláken „A“ tímto způsobem aktivován nebyl.

Nakonec byly na oba typy nanovláken imobilizovány molekuly TTC, jako biologicky aktivní látky. Imobilizace probíhala jejich ponořením na dvě hodiny do ethanolického roztoku TTC o vhodné koncentraci a poté sušením za pokojové teploty.

#### ***4.5. Parametry stanovení TTC v SIA systému***

Pro měření byl používán SIA systém tvořený z následujících částí: obousměrného pístového čerpadla schopného aspirovat objemy roztoků od 1  $\mu\text{l}$ , šesticestného selekčního ventilu, teflonové mísící cívky, peristaltického čerpadla, USB 2000 UV-VIS detektoru, pružných hadiček pro peristaltické čerpadlo o průměru 0,75 mm. Celý systém byl řízen počítačem se softwarem FIALab for Windows 5.0. Jako nosný proud byla používána ultračistá voda.

Tabulka 4: Parametry SIA systému

Objem systému	15 600 $\mu$ l
Objem odebraného vzorku (pro promytí portu a dvojnásobné dávkování)	320 $\mu$ l
Rychlost toku pro aspiraci vzorku	20 $\mu$ l/s
Rychlost toku pro detekci vzorku	30 $\mu$ l/s
Dávkovaný objem pro kalibraci	50 $\mu$ l
Dávkovaný objem pro jednotlivá měření vzorku	50 $\mu$ l
Otáčky magnetické míchačky	230 rpm
Otáčky peristaltického čerpadla	5,5 rpm
Délka 1 cyklu	5 min
Vlnová délka pro detekci TTC	500 nm

#### **4.6. Vývoj analytické metody**

Byly proměřeny dvě kalibrační závislosti, každá pro jeden z používaných tlumivých roztoků, a to za použití standardů TTC o již zmíněných koncentracích v kapitole 4.3. Každý standard byl změřen třikrát a pro vyhodnocení křivky byly následně využity průměrné hodnoty z těchto tří stanovení.

Pro tato měření byl používán kalibrační program o třech cyklech, nastaven pro využívání různých portů pro aspiraci různého standardu a pro jeho následnou detekci ve spektrofotometru.

Kalibrační program je detailně rozepsán v příloze č.1.

#### **4.7. Kalibrační rozmezí pro stanovení TTC v SIA systému**

Bylo testováno 6 různých koncentrací standardů, jejichž příprava byla popsána v kapitole 4.3. Přímky byly popsány rovnicí  $y = k \cdot x + q$ , kde  $y$  odpovídá hodnotě signálu,  $k$  je směrnice přímky,  $x$  je koncentrace roztoku a  $q$  absolutní člen směrnice přímky. Linearita byla hodnocena pomocí korelačního koeficientu.

#### **4.8. Postup měření pro monitorování liberačního profilu**

Měření probíhalo v SIA systému za pomoci ovládacího programu vytvořeného v softwaru FIAlab for Windows 5.0.

Nejprve bylo potřeba celý průtokový systém řádně promýt a to konkrétně ultračistou vodou a poté tlumivým roztokem, který byl určitý den používán k měření. K tomuto účelu byly využity již vytvořené programy, postupně spouštěné tak, aby došlo k promytí veškerých využívaných součástí systému.

Následně byla před každou liberací proměřena zkrácená kalibrační křivka se standardními roztoky pomocí předem nastaveného programu „*calibration UV\_50µl.fia*“ a současně zapnuto ohřívání vodní lázně, aby se temperovala (pro měření byla používána teplota 32°C nebo 37°C).

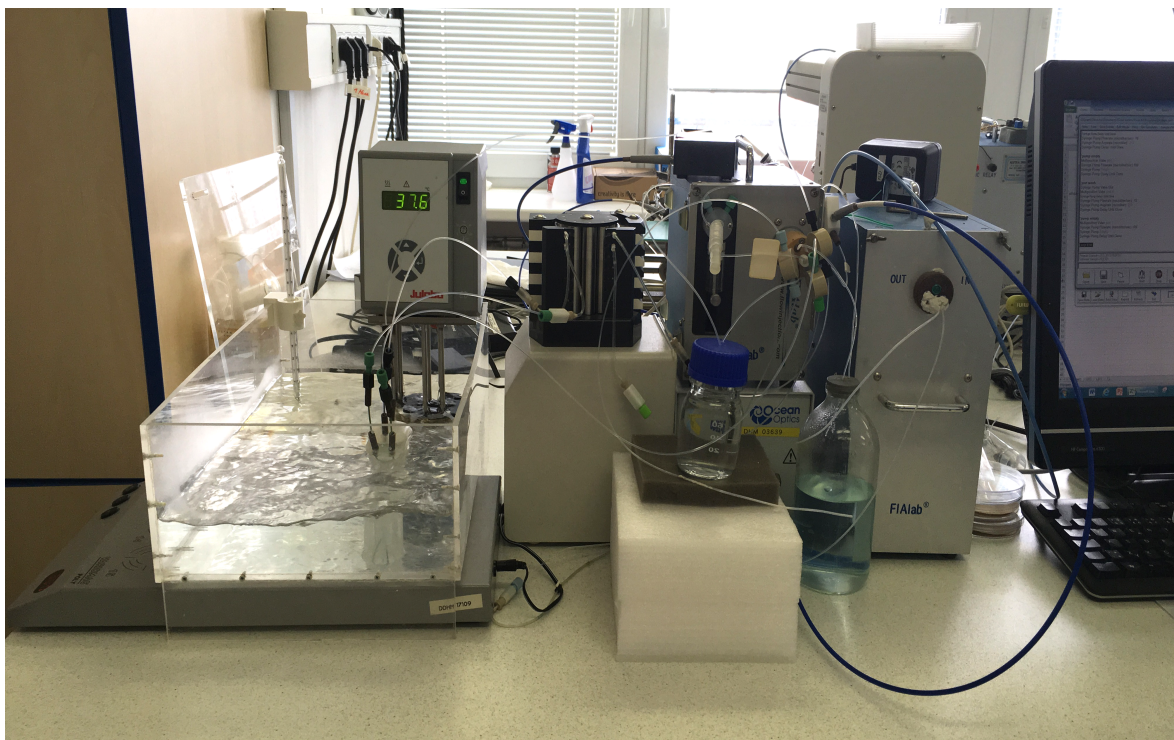
Další postup zahrnoval přípravu pro samotnou liberaci. Do dolní akceptorové části Franzovy difúzní cely, ponořené do vytemperované vodní lázně, bylo až po okraj

napipetováno 15,60 ml tlumivého roztoku, který byl, pro udržování stejné koncentrace, po celou dobu měření míchán za využití elektromagnetické míchačky. Do plnicího otvoru pro odběr vzorku a doplnění tlumivého roztoku byly zasunuty dvě PTFE hadičky. Pokud bylo měření prováděno s membránovým filtrem, ten byl pomocí pinzety opatrně, tak aby na hladině pod ním nevznikly žádné vzduchové bubliny, rozložen na akceptorovou část a na něj byl následně, také pomocí pinzety, umístěn vzorek - nanovláknový nosič s TTC. Nakonec byla Franzova cela zakryta horní donorovou částí a celá konstrukce cely po stranách zpevněna gumičkami. Liberace byla prováděna nejprve za pomoci jedné Franzovy cely a poté, pro urychlení experimentu, byly již využívány tři, a to s odstupem dávkování 5 minut z jednotlivých Franzových cel. Celkový čas jednoho cyklu byl v tomto případě tedy 15 minut.

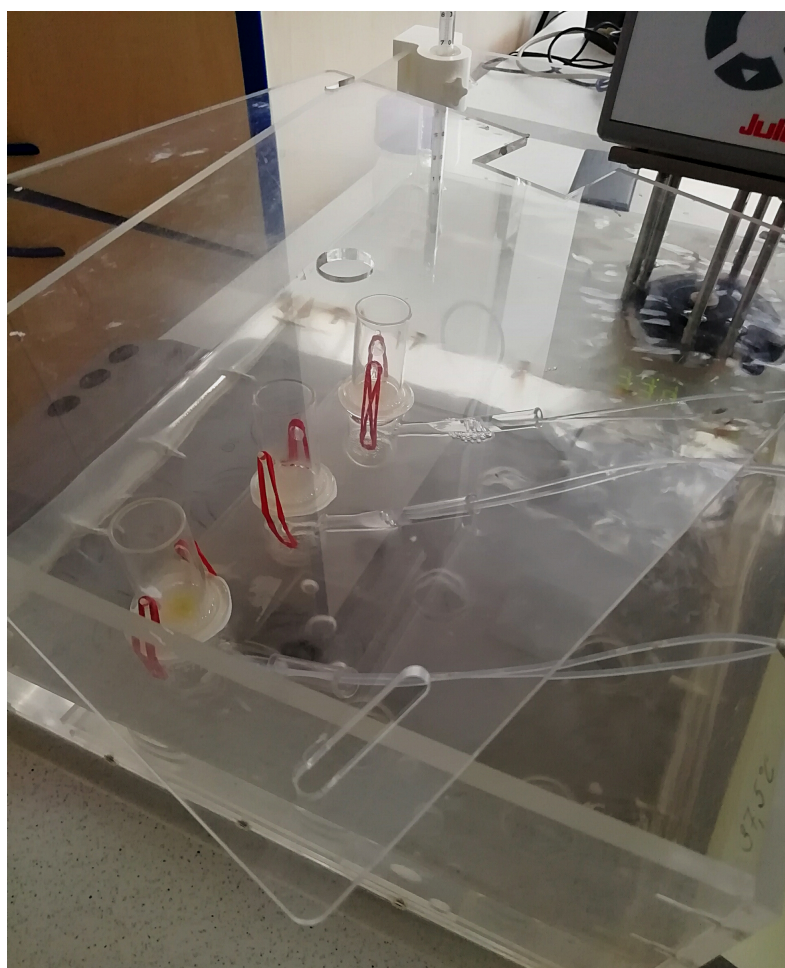
Pro měření monitorování byl používán předem nastavený program o délce trvání jednoho cyklu 5 minut pro jednu celu. Základní opakující se kroky byly promytí dávkovacího portu menším objemem a odeslání do odpadu, aspirace nosného proudu, dvojnásobná aspirace vzorku a jeho odeslání k detekci do spektrofotometru, odstranění roztoků do odpadu a doplnění liberačního média (pufu) ve Franzově cele (viz. Příloha č. 2).

Pro různý materiál membránových filtrů bylo potřeba využít různý počet měřících cyklů od 12, za využití jedné Franzovy cely, do 50, kdy byly již využívány cely tři a tedy měřeny tři vzorky zároveň. K tomuto účelu musel být program rozšířen o příkazy, které se týkaly změny čísla portu pro aspiraci vzorku a doplnění pufu do dané Franzovy cely.

Zapojení systému a Franzovy cely je znázorněno na obrázcích 17 a 18.



Obrázek 17 - Zapojení systému



Obrázek 18 - Franzovy cely ve vodní lázni zapojené do systému

## 5. Výsledky a diskuze

K odečítání veškerých výsledných hodnot byl použit program FIALab software for Windows 5.0. a k jejich následnému zpracování využíván Microsoft Office Excel.

### 5.1. Kalibrace pro stanovení tetracyklinu

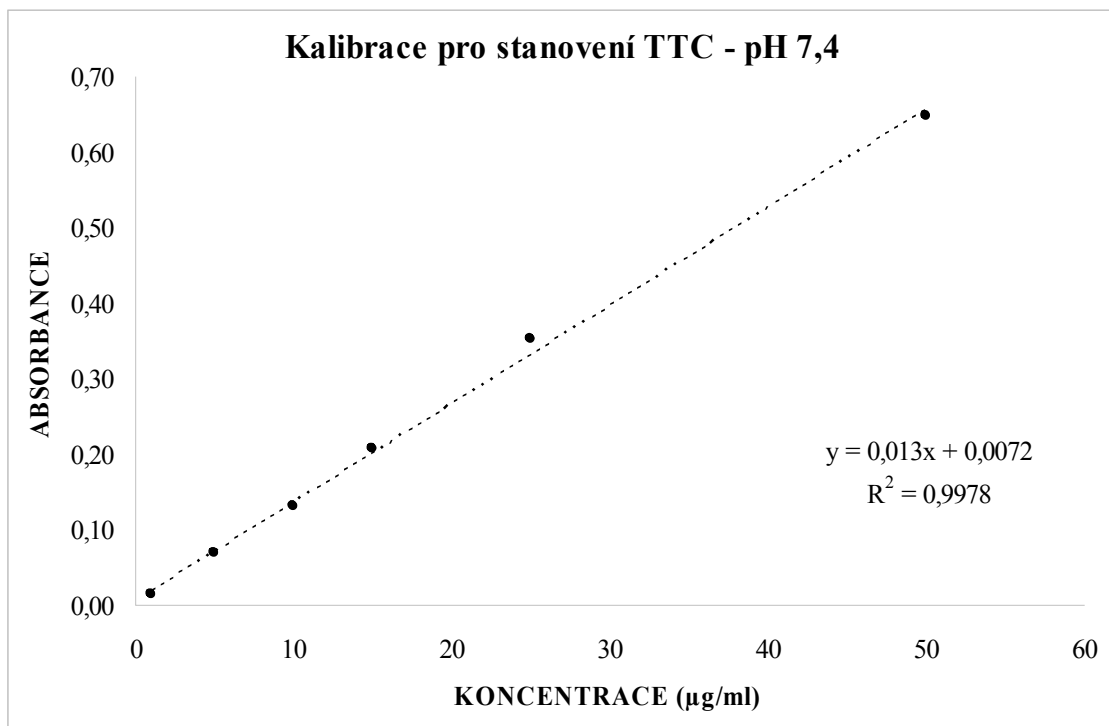
Pro každý typ tlumivého roztoku byla ke zjištění lineárního rozsahu změřena jedna kalibrační závislost. Minimální požadovaná hodnota determinačního koeficientu je pro praktická měření 0,99, přičemž tento požadavek obě kalibrační křivky splnily.

#### 5.1.1. Kalibrační křivka pro tlumivý roztok o pH 7,4

Pro toto pH byly proměřeny standardní roztoky o koncentracích 1, 5, 10, 15, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ , přičemž všechny tyto hodnoty byly detekovatelné a kvantifikovatelné. V oblasti od 1 do 50  $\mu\text{g/ml}$  je tato kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci měřeného analytu lineární s hodnotou determinačního koeficientu 0,9978 (Tabulka 5).

Tabulka 5: Kalibrace v rozmezí 1 – 50  $\mu\text{g/ml}$

<b>koncentrace (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>průměr</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>1</b>	0,014	0,013	0,012	0,013	0,001	4,97
<b>5</b>	0,070	0,070	0,071	0,070	0,001	0,88
<b>10</b>	0,132	0,131	0,133	0,132	0,001	0,76
<b>15</b>	0,209	0,207	0,205	0,207	0,001	0,63
<b>25</b>	0,357	0,350	0,352	0,353	0,003	0,83
<b>50</b>	0,654	0,643	0,647	0,648	0,005	0,72



Obrázek 19 - Kalibrační závislost pro stanovení TTC za využití tlumivého roztoku o pH 7,4

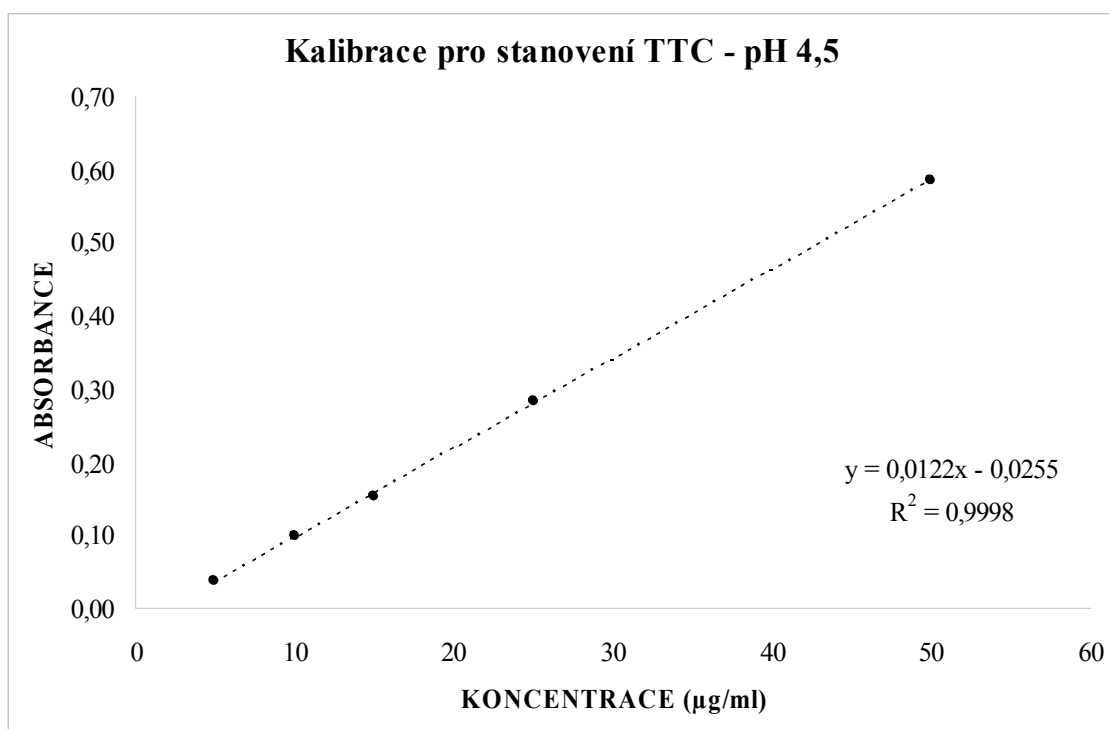


### 5.1.2. Kalibrační křivka pro tlumivý roztok o pH 4,5

K proměření kalibrační křivky při této hodnotě pH byly použity standardní roztoky o stejných koncentracích jako v předchozím případě, ale s tím rozdílem, že roztok o koncentraci 1 µg/ml se i po opakovaném proměřování nepodařilo detekovat a v grafu je tudíž zahrnuto pouze 5 zbývajících koncentrací. V oblasti od 5 do 50 µg/ml je tato kalibrační křivka lineární s hodnotou determinačního koeficientu 0,9998 (Tabulka 6).

Tabulka 6: Kalibrace v rozmezí 5 – 50 µg/ml

<i><b>koncentrace (µg/ml)</b></i>	<i><b>1</b></i>	<i><b>2</b></i>	<i><b>3</b></i>	<i><b>průměr</b></i>	<i><b>SD</b></i>	<i><b>RSD (%)</b></i>
<b>5</b>	0,037	0,037	0,036	0,037	0,000	1,22
<b>10</b>	0,099	0,097	0,097	0,098	0,001	0,59
<b>15</b>	0,153	0,152	0,151	0,152	0,001	0,54
<b>25</b>	0,283	0,286	0,279	0,283	0,003	0,97
<b>50</b>	0,589	0,579	0,583	0,584	0,004	0,72



Obrázek 20 - Kalibrační závislost pro stanovení TTC za využití tlumivého roztoku o pH 4,5

## 5.2. *Liberace TTC*

Měření byla rozdělena podle typu nanovláknenného nosiče pro TTC, teploty, pH tlumivého roztoku a membránového filtru použitého jako podklad pro testovaný nanovláknenný materiál (Tabulka 7). Hodnoty pH byly vybrány tak, aby zastupovaly jak stav fyziologický (pH 4,5), tak stav porušené kůže (pH 7,4) a pro porovnání bylo pro kyslejší pH měření prováděno také za vyšší teploty (37°C), což reprezentuje stav, kdy je kůže neporušená, ale probíhá v ní zánět.

Výsledné hodnoty, charakterizované výškou píků, byly porovnávány vůči standardnímu roztoku o koncentraci 10 µg/ml a byly následně využity pro vytvoření jednotlivých liberačních profilů, a to jako grafy závislosti průměrných hodnot absorbancí ze dvou, případně tří měření, na čase (min). Sestavené grafy byly mezi sebou následně porovnávány, a to za účelem vyhodnocení, který z použitých membránových filtrů je pro danou liberaci nejvhodnější. To znamená, že její průběh příliš neovlivňuje, ale dostatečně ho prodlouží tak, aby byly lépe patrné rozdíly v testovaných materiálech. Po tomto vyhodnocení byl pro liberaci za podmínek pH 4,5 a teploty 32°C, které reprezentovaly stav neporušené zdravé kůže, používán už jen tento konkrétně vybraný membránový filtr.

*Tabulka 7: Liberace – souhrn podmínek*

<b>Vzorky</b>	T-A; T-AK
<b>Teplota</b>	32°C; 37°C
<b>pH</b>	7,4; 4,5
<b>Membránový filtr</b>	-; PA; HTTP; HAWP; PTFE

Pro ilustraci jsou u prvního případu liberace, kromě grafů, uvedeny také tabulky naměřených hodnot v konkrétním čase pro všechny použité membránové filtry.

Získané hodnoty v grafech byly proloženy spojnicí trendu typu polynomu 2. až 6. stupně. Ke všem jednotlivým bodům jsou také přidány chybové úsečky, které znázorňují variabilitu získaných dat.

Nejprve bylo testování membránových filtrů provedeno pro oba typy nanovlákných nosičů za podmínek pH 7,4 a teploty 32°C. Výsledky byly zároveň použity pro porovnání T-A a T-AK liberačních profilů.

### 5.2.1. Liberace z T-A nanovláken při pH 7,4 a teplotě 32°C

Tabulka 8: Liberace TTC při použití membránového filtru PA

min	měření 1	měření 2	průměr	SD	RSD (%)
2,5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
7	0,063	0,115	0,089	0,026	29,07
12	0,110	0,215	0,162	0,052	32,18
17	0,138	0,256	0,197	0,059	30,13
22	0,161	0,257	0,209	0,048	22,93
27	0,160	0,278	0,219	0,059	26,87
32	0,165	0,265	0,215	0,050	23,27
37	0,183	0,277	0,230	0,047	20,48
42	0,229	0,283	0,256	0,027	10,42
47	0,260	0,289	0,275	0,015	5,42
52	0,266	0,289	0,278	0,012	4,15
57	0,275	0,298	0,286	0,011	3,99

Tabulka 9: Liberace TTC při použití membránového filtru HTTP

min	měření 1	měření 2	průměr	SD	RSD (%)
2,5	0,002	0,016	0,009	0,007	82,78
7	0,180	0,277	0,229	0,048	21,10
12	0,370	0,364	0,367	0,003	0,80
17	0,385	0,369	0,377	0,008	2,12
22	0,398	0,376	0,387	0,011	2,81
27	0,401	0,396	0,398	0,003	0,67
32	0,378	0,377	0,378	0,000	0,13
37	0,399	0,389	0,394	0,005	1,29
42	0,395	0,410	0,402	0,008	1,88
47	0,411	0,372	0,391	0,020	5,01
52	0,410	0,358	0,384	0,026	6,74
57	0,398	0,353	0,376	0,022	5,96

Tabulka 10: Liberace TTC při použití membránového filtru HAWP

min	měření 1	měření 2	průměr 3	průměr	SD	RSD (%)
2,5	0,048	0,033	0,006	0,029	0,018	60,13
17	0,222	0,225	0,188	0,212	0,017	7,83
32	0,253	0,290	0,261	0,268	0,016	5,97
47	0,276	0,337	0,303	0,305	0,025	8,12
62	0,244	0,396	0,292	0,311	0,064	20,44
77	0,293	0,401	0,296	0,330	0,050	15,24
92	0,314	0,449	0,306	0,356	0,065	18,35
107	0,289	0,424	0,305	0,339	0,060	17,77
122	0,280	0,400	0,312	0,331	0,051	15,41
137	0,227	0,341	0,314	0,294	0,049	16,60
152	0,215	0,349	0,308	0,291	0,056	19,35
167	0,212	0,308	0,295	0,272	0,042	15,63
182	0,167	0,300	0,295	0,254	0,062	24,27
197	0,186	0,251	0,289	0,242	0,042	17,46
212	0,239	0,329	0,279	0,282	0,037	13,14
227	0,191	0,279	0,268	0,246	0,039	16,04
242	0,189	0,282	0,263	0,245	0,040	16,27
257	0,188	0,284	0,251	0,241	0,040	16,52
272	0,179	0,281	0,241	0,234	0,042	18,07
287	0,170	0,278	0,242	0,230	0,045	19,66
302	0,189	0,288	0,241	0,239	0,040	16,90
317	0,176	0,270	0,223	0,223	0,039	17,28
332	0,177	0,280	0,222	0,226	0,042	18,61

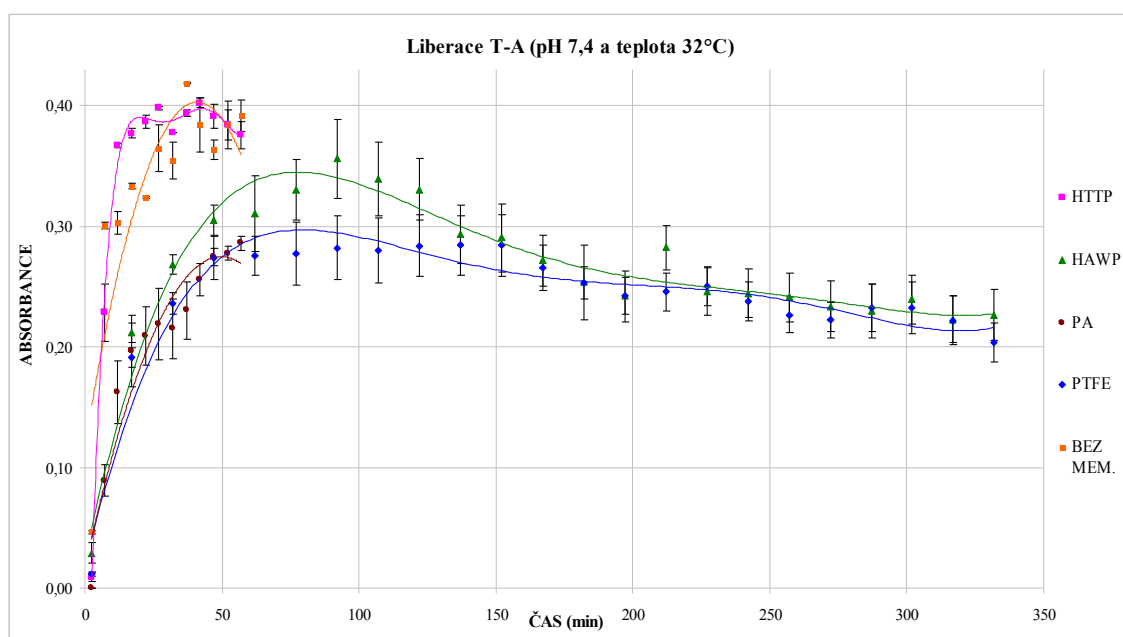
Tabulka 11: Liberace TTC při použití membránového filtru PTFE

min	měření 1	měření 2	průměr	SD	RSD (%)
2,5	0,016	0,008	0,012	0,004	32,21
17	0,207	0,175	0,191	0,016	8,43
32	0,254	0,218	0,236	0,018	7,63
47	0,310	0,237	0,274	0,037	13,36
62	0,308	0,243	0,275	0,032	11,77
77	0,329	0,226	0,277	0,051	18,54
92	0,336	0,229	0,282	0,053	18,83
107	0,334	0,226	0,280	0,054	19,28
122	0,336	0,233	0,284	0,052	18,16
137	0,333	0,235	0,284	0,049	17,28
152	0,335	0,233	0,284	0,051	17,87
167	0,304	0,228	0,266	0,038	14,31
182	0,281	0,226	0,253	0,027	10,81
197	0,273	0,212	0,243	0,031	12,75
212	0,277	0,215	0,246	0,031	12,65

227	0,283	0,218	0,251	0,033	13,03
242	0,271	0,205	0,238	0,033	13,82
257	0,256	0,197	0,227	0,030	13,11
272	0,251	0,193	0,222	0,029	13,14
287	0,273	0,192	0,233	0,040	17,31
302	0,275	0,190	0,232	0,043	18,44
317	0,263	0,181	0,222	0,041	18,47
332	0,235	0,172	0,204	0,032	15,54

Tabulka 12: Liberace TTC bez použití membránového filtru

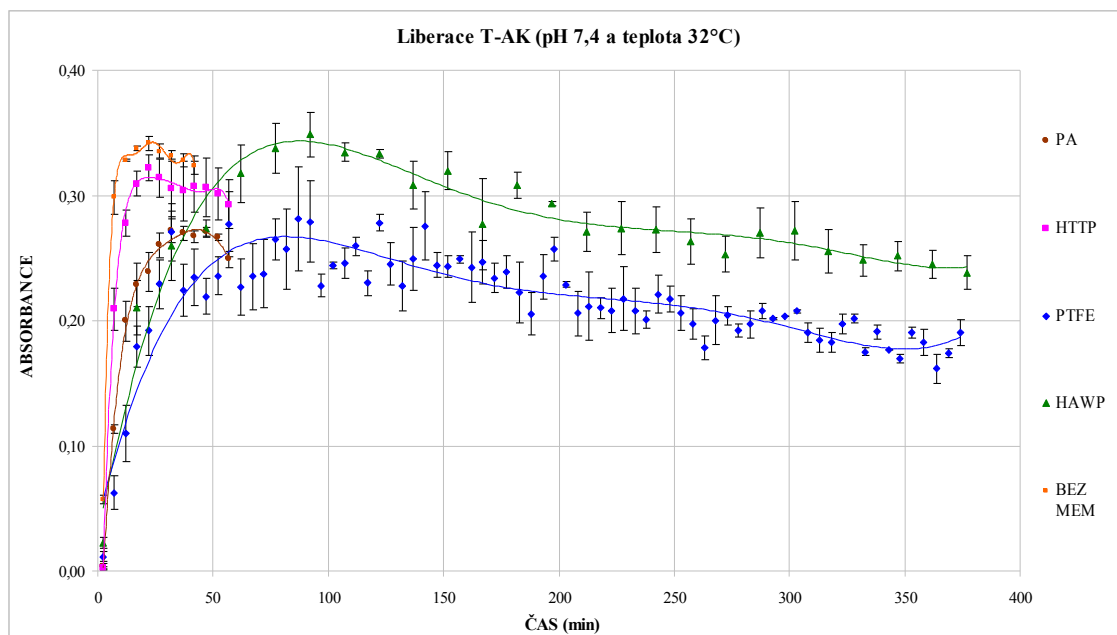
min	měření 1	měření 2	průměr	SD	RSD (%)
2,5	0,044	0,049	0,047	0,003	5,69
7	0,296	0,306	0,301	0,005	1,63
12	0,284	0,322	0,303	0,019	6,38
17	0,338	0,329	0,333	0,004	1,31
22	0,322	0,326	0,324	0,002	0,68
27	0,327	0,403	0,365	0,038	10,44
32	0,324	0,385	0,355	0,030	8,55
37	0,419	0,418	0,419	0,001	0,12
42	0,429	0,339	0,384	0,045	11,78
47	0,379	0,348	0,364	0,015	4,26
52	0,425	0,344	0,384	0,040	10,50
57	0,418	0,366	0,392	0,026	6,68



Obrázek 21 - Graf závislosti absorbance na čase pro vzorek T-A při pH 7,4 a teplotě 32°C

Zhodnocení profilů: Liberace vzorku typu T-A bez použití membránového filtru, s HTTP a PA filtrem proběhly příliš rychle, oproti tomu filtry HAWP a PTFE liberaci prodloužily natolik, že byly dostatečně zviditelněné rozdíly u jednotlivých profilů.

### 5.2.2. Liberace z T-AK nanovláken při pH 7,4 a teplotě 32°C

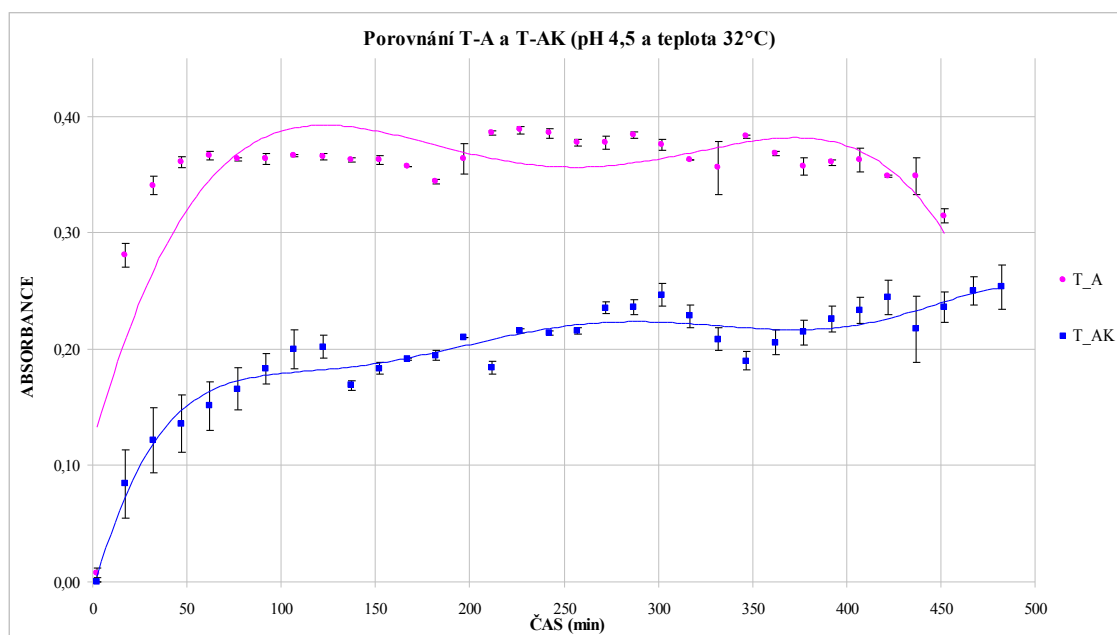


Obrázek 22 - Graf závislosti absorbance na čase pro vzorek T-AK při pH 7,4 a teplotě 32°C

Zhodnocení profilů: U liberace vzorku T-AK bylo dosaženo podobných výsledků jako u vzorku předchozího. Nejpřehlednější profily byly opět ty s membránovými filtry typu HAWP a PTFE.

Pro následující liberace TTC byl již testován pouze membránový filtr typu HAWP, jelikož byl vzhledem k předchozím měřením vybrán jako nejvhodnější pro detailní sledování rozdílů mezi jednotlivými profily a na rozdíl od PTFE filtru s ním bylo při liberaci dosaženo také vyšších hodnot absorbance, což znamená uvolňování většího množství TTC. Veškerá další měření s tímto konkrétním filtrem byla prováděna za pH 4,5 a teploty 32°C/ 37°C.

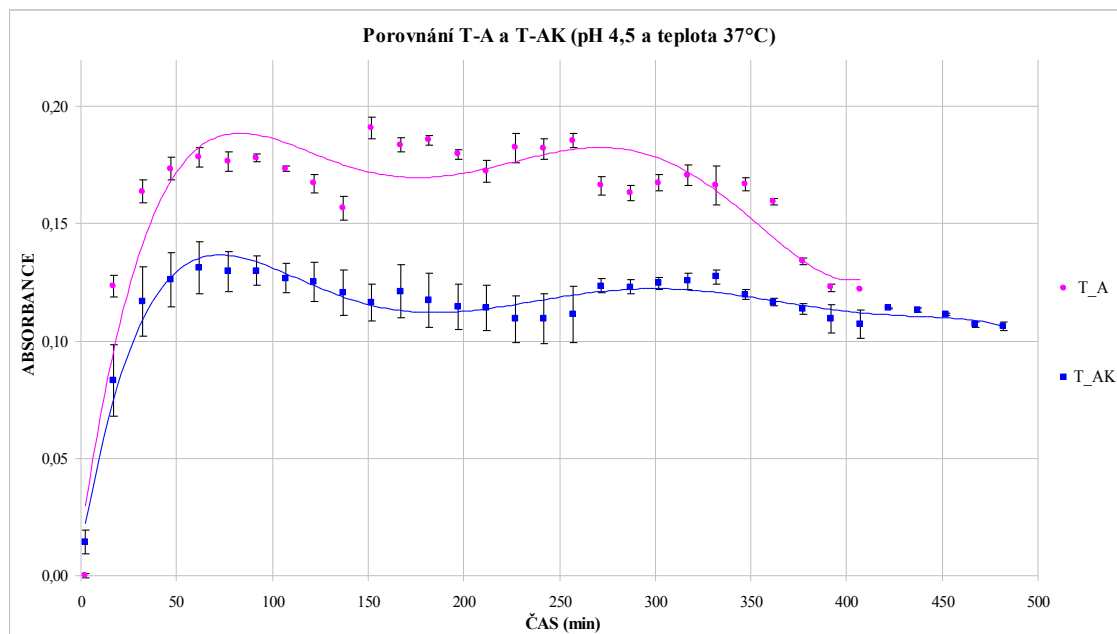
### 5.2.3. Porovnání liberace z T-A a T-AK nanovláken při pH 4,5 a teplotě 32°C



Obrázek 23 - Porovnání liberačních profilů vzorků T-A a T-AK při pH 4,5 a teplotě 32°C

Zhodnocení profilů: Z grafu je patrné, že za těchto podmínek vzorek T-A dosahoval téměř po celou dobu měření asi dvakrát vyšších hodnot absorbance než vzorek T-AK. V čase kolem 350. minuty u něj docházelo už jen k postupnému poklesu těchto hodnot, v důsledku uvolnění kompletního množství TTC a dalšího naředění roztoku čistým liberačním médiem na rozdíl od křivky vzorku T-AK, kde absorbance naopak znovu mírně narůstala, protože ještě nebyl uvolněn veškerý TTC. Toto zjištění odpovídá předpokladu, že vzorek T-AK vykazuje silnější vazbu TTC než vzorek T-A. Ale předpoklad většího množství navázaného TTC ve vzorku T-AK se po dobu tohoto liberačního testu nepotvrdil.

#### 5.2.4. Porovnání liberace z T-A a T-AK nanovláken při pH 4,5 a teplotě 37°C



Obrázek 24 - Porovnání liberačních profilů vzorků T-A a T-AK při pH 4,5 a teplotě 37°C

Zhodnocení profilů:

Při této vyšší teplotě dosahoval vzorek T-A opět vyšších hodnot absorbance než vzorek T-AK. Průběhem jsou si liberační profily podobné, kolem 350. minuty hodnoty už pouze klesaly v případě obou křivek a to vlivem naředění liberačního média po uvolnění veškerého množství TTC. Liberace vzorku T-A byla ukončena o téměř 100 minut dříve, jelikož zde v této době nastal mnohem znatelnější pokles absorbance, než u vzorku T-AK, kde je průběh plynulejší.

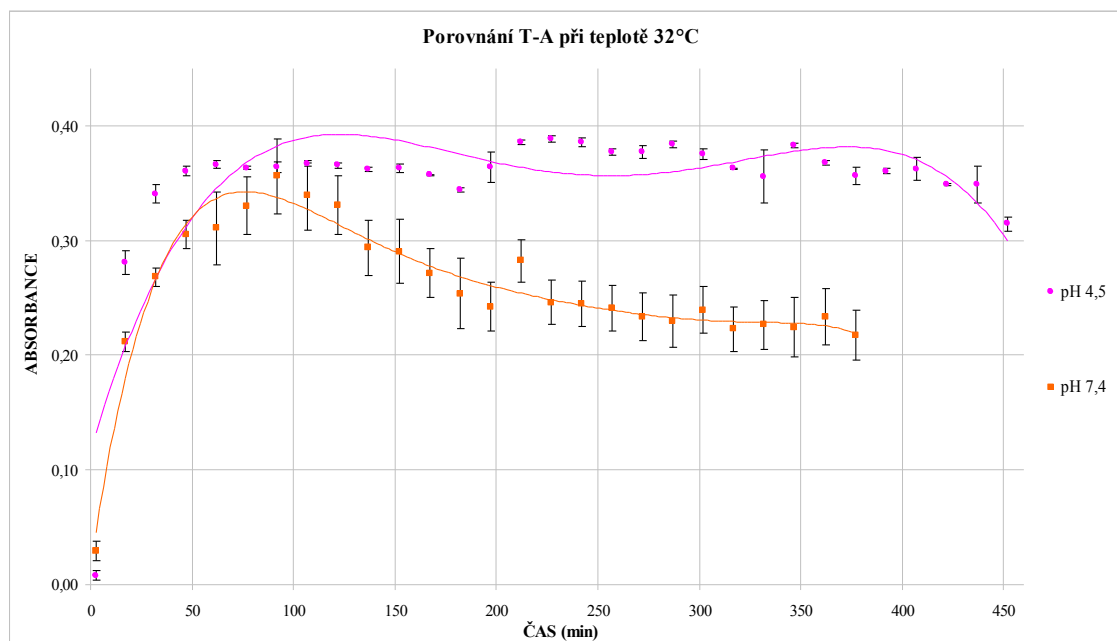
Vzájemné porovnání obou grafů:

Při měření za teploty 32°C bylo u obou vzorků dosaženo vyšších hodnot absorbance než za teploty 37°C, přičemž tento rozdíl je více patrný v případě vzorku T-A, kdy jsou hodnoty vyšší asi dvakrát v průběhu celé liberace. Nižší hodnoty naměřené absorbance mohou souviset se stabilitou TTC při vyšší teplotě a takto dlouhém liberačním testu. V čase kolem 350. min už pozorujeme u všech profilů, s výjimkou profilu vzorku T-AK při teplotě 32°C, pokles měřených hodnot, přičemž v případě T-A je tento pokles razantnější.



V následujících dvou grafech je znázorněno porovnání liberačních profilů každého ze vzorků a to vzhledem k rozdílnému pH, ale stejné teplotě (32°C).

### 5.2.5. Porovnání liberace z T-A nanovláken při různém pH

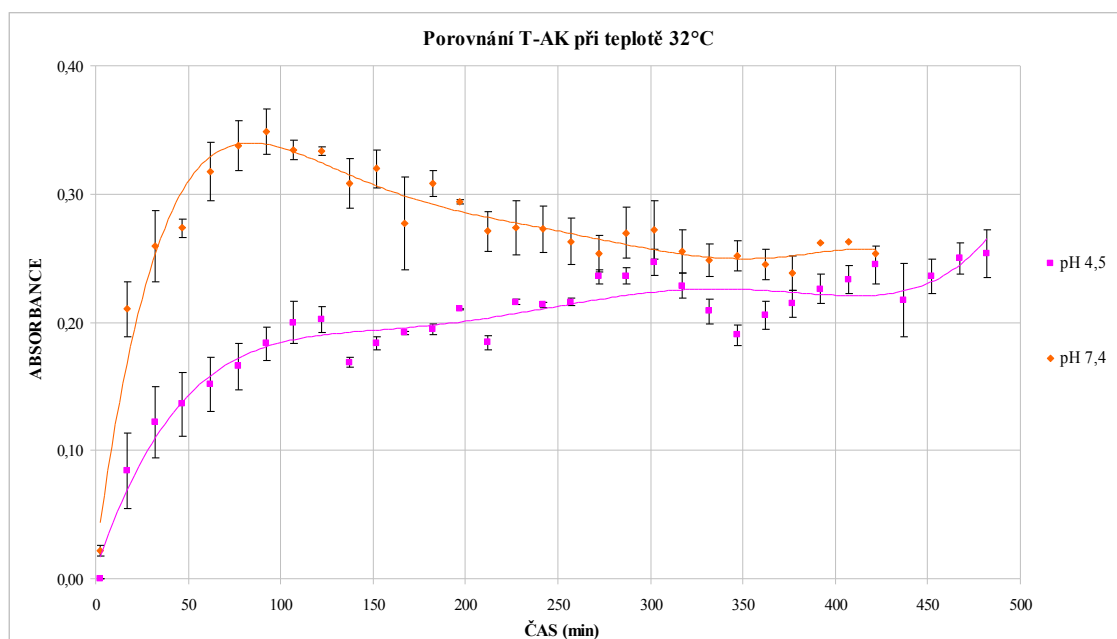


Obrázek 25 - Porovnání liberačních profilů vzorku T-A při různém pH a teplotě 32°C

Zhodnocení profilů:

U obou liberačních profilů tohoto vzorku byl pozorován prudký počáteční nárůst. Dále je zřejmé, že v případě pH 4,5 byla liberace plynulejší, kdy měřené hodnoty opakovaně jen mírně narůstaly a klesaly, na rozdíl od měření při pH 7,4. V tomto případě již asi po 90 minutách začala absorbance už jen pozvolna klesat a liberace byla tudíž ukončena o 80 min dříve. Tento rozdíl může být vysvětlen odlišnou stabilitou TTC při různém pH.

### 5.2.6. Porovnání liberace z T-AK nanovláken při různém pH



Obrázek 26 - Porovnání liberačních profilů vzorku T-AK při různém pH a teplotě 32°C

Zhodnocení profilů:

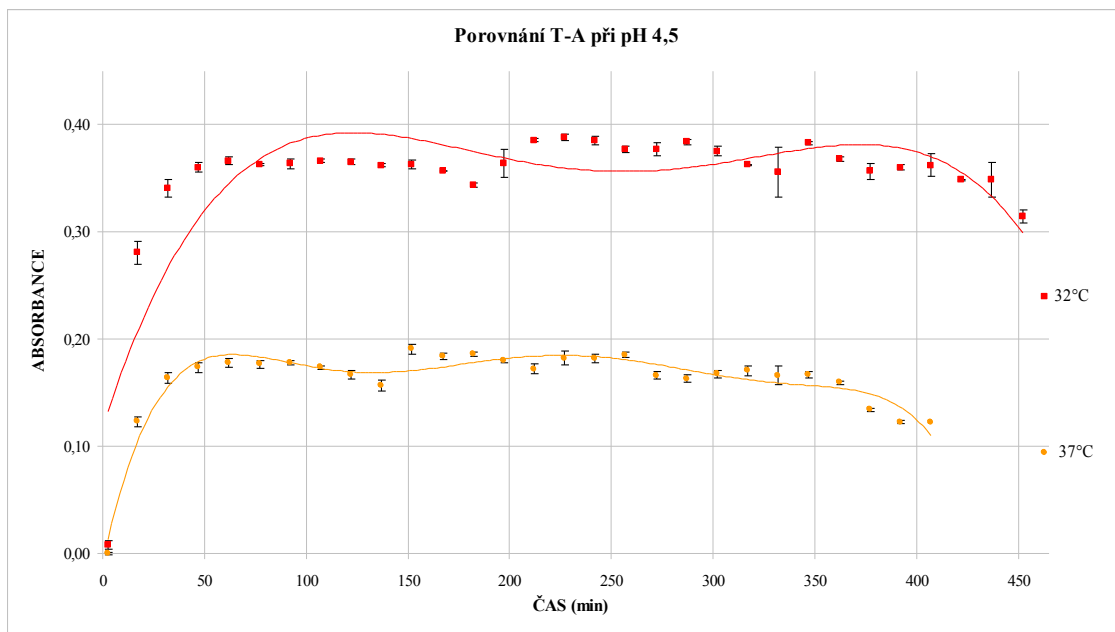
V případě tohoto vzorku při pH 4,5 nedošlo z počátku k tak razantnímu nárůstu absorbance jako u měření při pH 7,4. Liberace také probíhala pomaleji a absorbance, až na pár bodů, po celou dobu narůstala. Pro pH 7,4 hodnoty od 90. minuty pozvolně klesaly z důvodu naředění roztoku liberačním médiem po uvolnění veškerého množství TTC.

Vzájemné porovnání obou grafů:

Křivky při pH 7,4 měly v obou případech velice podobný průběh, k nejvyššímu nárůstu absorbance došlo u vzorků v 90. minutě měření a po tomto čase už obě křivky pozvolna klesaly, což bylo ovlivněno nižší stabilitou TTC v prostředí více bazického pH. U liberace při pH 4,5 byly rozdíly znatelnější – absorbance sice střídavě narůstala a klesala, ale u vzorku T-A se veškeré hodnoty, až na ty počáteční, pohybovaly v rozmezí od 0,30 do 0,40, což v případě druhého vzorku T-AK nepozorujeme ani v jednom naměřeném bodě. Zde dosahuje nejvyšší hodnota 0,25, ale oproti vzorku T-A, hodnoty i ve 450. minutě stále narůstaly.

V následujících dvou grafech je znázorněno porovnání liberačních profilů každého ze vzorků, a to vzhledem k rozdílné teplotě, ale stejnému pH (4,5).

### 5.2.7. Porovnání liberace z T-A nanovláken při různé teplotě

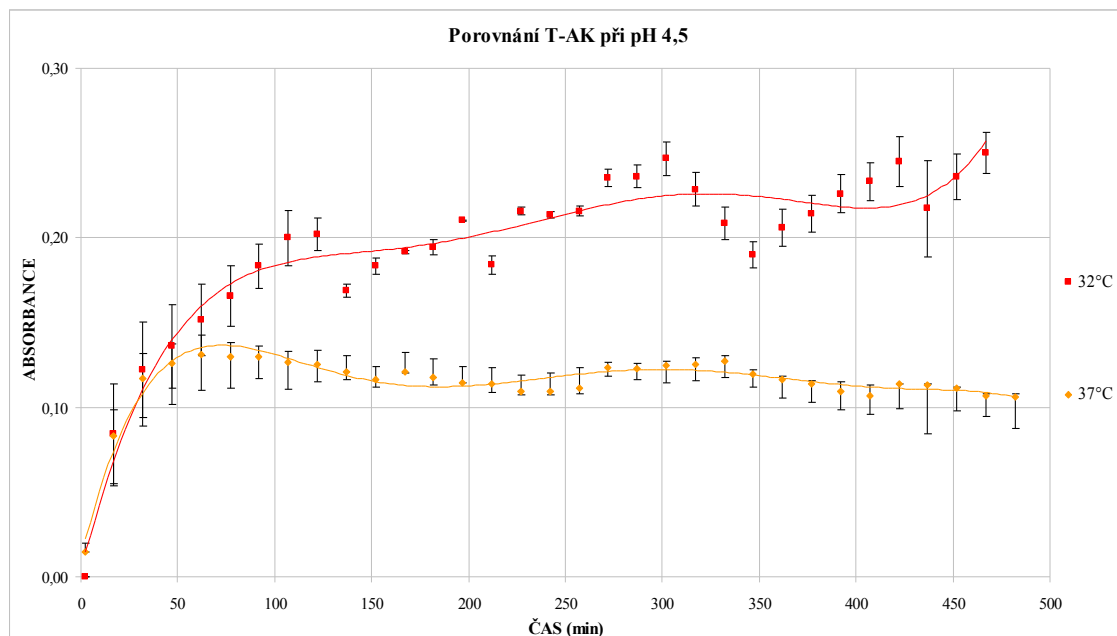


Obrázek 27 - Porovnání liberačních profilů vzorku T-A při různé teplotě a pH 4,5

Zhodnocení profilů:

Při teplotě 32°C se absorbance pohybovala v rozmezí od 0,30 do 0,40, ale při měření za teploty 37°C byly získané hodnoty výrazně nižší, zde konkrétně v rozmezí od 0,10 do 0,20. Pravděpodobně se opět jedná o rozklad TTC při vyšší teplotě a dlouhé době liberačních testů. Průběhem i délkou měření si byly profily podobné, výrazné výkyvy hodnot absorbancí nebyly pozorovány ani u jedné z teplot.

### 5.2.8. Porovnání liberace z T-AK nanovláken při různé teplotě



Obrázek 28 - Porovnání liberačních profilů vzorku T-AK při různé teplotě a pH 4,5

Zhodnocení profilů:

Při teplotě 32°C křivka v čase postupně narůstala, přičemž nejvyšší získaná hodnota absorbance 0,25 byla zachycena v 300. minutě měření. Křivka při teplotě 37°C měla znatelně plynulejší průběh, kdy nejvyšší hodnota byla naměřena už v 60. minutě liberace s hodnotou přibližně 0,14. Opět se pravděpodobně jedná o rozklad TTC při vyšší teplotě.

Vzájemné zhodnocení obou grafů:

Bylo zjištěno, že při nižší teplotě 32°C dosahovala absorbance vyšších hodnot, než při teplotě 37°C, přičemž u vzorku T-A se, až na počáteční body, tyto hodnoty pohybovaly v rozmezí od 0,30 do 0,40 a u vzorku T-AK nejvyšší hodnota dosáhla 0,25. Nejdélší liberace TTC byla zaznamenána u vzorku T-AK, konkrétně při teplotě 32°C, kde byl pozorován nárůst hodnot i po 450. minutě.

## 6. Závěr

V této diplomové práci byla, za využití SIA systému, sledována liberace TTC, jako biologicky aktivní látky, ze dvou typů nanovláknenných nosičů. Vzhledem k odlišnému postupu při jejich výrobě, kterou realizovala Technická univerzita v Liberci, se předpokládal také různý průběh liberací TTC. K ovlivnění průběhu přispívala také teplota, pH prostředí a membránové filtry.

Cílem tedy bylo potvrdit, zda u nosiče typu T-A nastane rychlejší uvolnění TTC a liberace bude mít tedy kratší průběh než u druhého nosiče T-AK. Při měřeních byly hodnoceny výšky píků a následně byly sestrojeny grafy liberačních profilů závislosti absorbance na čase, které byly mezi sebou porovnávány.

Z hodnocení profilů vyplynulo, že liberace z nanovláknenného nosiče typu T-AK probíhala opravdu delší dobu, než u druhého nosiče T-A. Například za podmínek 32°C a pH 4,5, což jsou podmínky charakterizující zdravou nepoškozenou kůži, pozorujeme, že i při ukončení liberace téměř po 500 minutách měření docházelo neustále k nárůstu hodnot absorbance.

Byl tedy potvrzen předpoklad pevnější vazby TTC na T-AK nosič. Této pevnější vazby bylo zřejmě docíleno při výrobním postupu, při kterém bylo pro aktivaci povrchu nanovláken využito metody silanizace s molekulami APTES jako silanizačního činidla.

Pokud hodnotíme liberaci ve vztahu k rozdílným teplotám, tak za vyšší teploty byly naměřené hodnoty absorbance u obou typů nosičů výrazně nižší, což bylo zřejmě zapříčiněno nižší stabilitou TTC a jeho rychlejším rozkladem při vyšší teplotě. Také liberační profily měřené při vyšším pH měly pro oba nosiče podobný charakter, kdy v obou případech došlo mnohem rychleji (již 90. minuta měření) k poklesu absorbance, což může být opět vysvětleno nižší stabilitou TTC při vyšším pH.

Závěrem lze tedy říci, že při liberaci TTC, jak při vyšší teplotě, tak při vyšším pH, je riziko rozkladu účinné látky vyšší, přičemž toto jsou podmínky, které charakterizují zánětem poškozenou kůži. Pro T-AK nosič vykazuje TTC pevnější vazbu a je tedy i delší průběh liberace, což je nejvíce viditelné na případě liberace za podmínek zdravé kůže – nižší teplota a fyziologické pH.

## 7. Literatura

- [1] KRÍŽEK, M., ŠÍMA, J. Analytická chemie. České Budějovice, 2015. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ©2015. ISBN 978-80-7394-486-5.
- [2] RŮŽIČKA, J. Flowinjectiontutorial.com. Flow Injection Analysis: Tutorial & News on Flow Based micro Analytical Techniques [Online]. 2019th ed. [cit. 2020-12-15].
- [3] SKLENÁŘOVÁ, H. Neseparační průtokové metody. Presentace k přednášce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/>
- [4] VRBATA, P. Nanovlákněné membrány jako nosiče léčiv. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Doležal, P.
- [5] BĚLÍKOVÁ, J. Kalcinace metal-organických nanovláken plazmatem za atmosférického tlaku. Brno, 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav fyzikální elektroniky. Vedoucí práce Kováčik, D.
- [6] PASEKOVÁ, H., POLÁŠEK, M. a SOLICH, P. Sekvenční injekční analýza. Chemické listy. 1999, (93), s. 354-356.
- [7] KLIMUNDOVÁ, J. Aplikace sekvenční injekční analýzy ve farmaceutické analýze. Hradec Králové, 2006. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Solich, P.
- [8] SKLENÁŘOVÁ, H. Automatizace a průtokové analytické techniky. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.
- [9] DUNDOVÁ, A. Vývoj automatizovaného SIA systému pro paralelní stanovení vybraných aniontů. Hradec Králové, 2010. Rigorózní práce. Univerzita Karlova,

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Solich, P.

[10] Flowinjection, FIA lab instruments, Sequential Injection Analysis [online]. ©2018. [cit. 2020-12-22]. Dostupné z:

[http://www.flowinjection.com/images/Sequential\\_Injection.pdf](http://www.flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf)

[11] MLADÁ, B. Spektrofluorimetrické stanovení derivátů fenothiazinu po jejich fotooxidaci, chemické a elektrochemické oxidaci. Praha, 2007. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta v Praze, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Rychlovský, P. a Nesměrák, K.

[12] PIMENTA, A.M., MONTENEGRO, M.C.B.S.M., ARAÚJO, A.N., CALATAYUD, J.M. Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, J. Pharm. Biomed. Anal. 2006, (40), s. 18.

[13] PETRÁŠ, D., KIMMER, D., SOUKUP, K. a KLUSOŇ, P. Bezpečná nanovlákná. Chemické listy. 2009, (103), s. 1009.

[14] BELHÁČOVÁ, M. Příprava nanovláken z vybraných polymerů s fosfazenovými aditivami. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta v Brně, Ústav chemie. Vedoucí práce Alberti, M.

[15] PARK, J. Y, LEE, I. H.. Characterization and Morphology of Prepared Titanium Dioxide Nanofibers by Electrospinning. Journal of nanoscience and nanotechnology. 2010, (10), s. 3402-5. 10.1166/jnn.2010.2300.

[16] PLŠKO, A. a EXNAR, P. Použitie metódy sól-gél pre prípravu špeciálnych materiálov, najmä skiel. Silikáty. 1989, (33(1)), s. 69-81. ISSN 0037-5241.

[17] STUDNIČKOVÁ, J. Anorganická nanovlákná na bázi oxidu křemičitého. Liberec, 2008. Autoreferát disertační práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. Vedoucí práce Odvárka, J.

[18] JELÍNEK, F. Příprava nanovláken SiO<sub>2</sub> s funkčními skupinami pro imobilizaci organických agens. Liberec, 2015. Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, Katedra chemie. Vedoucí práce Exnar, P.

[19] E-learningový server se studijními materiály pro obor Nanomateriály na Technické univerzitě v Liberci. Metoda sol-gel. Nano [studijní] materiály [online]. verze 2003. [cit. 2020-01-21] Dostupné z:

[https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/3345/mod\\_resource/content/0/4\\_metoda\\_sol\\_gel.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/3345/mod_resource/content/0/4_metoda_sol_gel.pdf)

[20] E-learningový server se studijními materiály pro obor Nanomateriály na Technické univerzitě v Liberci. Střídavé elektrické zvláknování. Nano [studijní] materiály [online]. 2015. [cit. 2020-01-14]. Dostupné z:

[https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5383/mod\\_resource/content/0/V\\_AC%20zvlaknovani%2010\\_6\\_2015.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5383/mod_resource/content/0/V_AC%20zvlaknovani%2010_6_2015.pdf)

[21] NGUYENOVÁ, J. Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 10. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Doležal, P.

[22] MORIKAWA, K., GREEN, M., NARAGHI, M. A Novel Approach for Melt Electrospinning of Polymer Fibers. Procedia Manufacturing. 2008, (26), s. 205-208. 10.1016/j.promfg.2018.07.028.

[23] Nanopharma - technologie [online]. ©2015 nanopharma. [cit.2020-01-03]. Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>

[24] TŮMOVÁ, P. Termické vlastnosti nanovláknenných membrán I. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Musilová, M.

[25] NS Technologie, Elmarco cz. Technologie Nanospider™ [online]. [cit. 2020-01-15]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>



- [26] JIRSÁK O. Czech innovation expo. Homepage – Czech innovation expo [online]. [cit. 2020-01-15] Dostupné z: <http://www.ciexpo.cz/rodokmen/oldrich-jirsak/>
- [27] CENGİZ ÇALLIOĞU, F., JIRSAK, O., DAYIK, M. Electric Current in Polymer Solution Jet and Spinnability in the Needleless Electrospinning Process. *Fibers Polym* 13, 1266–1271 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12221-012-1266-6>.
- [28] HUANG, Z. M., ZHANG, Y., KOTAKI, M. (2003). A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2003, (63), s. 2223-2253. 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
- [29] THOMPSON, C.J., CHASE, G., YARIN, A.L., RENEKER, D.H.. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer*. 2007, (48), s. 6913-6922. 10.1016/j.polymer.2007.09.017.
- [30] ŠLAMBOROVÁ, I. et al., Possibilities of immobilisation of selected bioactive compounds on nanofibers. In: PAZOUREK, A. a PROKOPČÁKOVÁ, P., eds. *Book of Extended Abstracts, PANMS (Potential and Application of Nanotreatment of Medical 63 Surfaces)*, Technical University of Liberec, 2011, s. 24. ISBN 978-80-7372-756-7.
- [31] QIAO, B. et al. High density silanization of nano-silica particles using -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Applied Surface Science*, 2015, (351), s. 646-654.
- [32] SWEETMAN, S.C. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 37th ed. Great Britain: Pharmaceutical Press, 2011. s. 170, 377–380. ISSN 0263-5364.
- [33] ACS Chemistry for life. Acs.org [online]. USA, 2013. [cit. 2020-01-26] Dostupné z: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/t/tetracycline.html>

## 8. Přílohy

### 8.1. Příloha č.1 – Program pro kalibraci

<u>Příkaz</u>	<u>Parametr</u>
Loop Start (#)	3
Syringe Pump Valve In	
Syringe Pump Flowrate (µl/sec)	70
Syringe Pump Aspirate (µl)	1000
Syringe Pump Delay Until Done	
Analyte New Sample	
Analyte Name	tetracyklin
Syringe Pump Valve Out	
Multiposition Valve	port 3
Syringe Pump Flowrate (µl/sec)	20
Syringe Pump Aspirate (µl)	50
Syringe Pump Delay Until Done	
Multiposition Valve	port 5
Syringe Pump Flowrate (µl/sec)	30
Syringe Pump Empty	
Spectrometer Absorbance Scanning	
Syringe Pump Delay Until Done	
Spectrometer Stop Scanning	
Loop End	

## 8.2. Příloha č.2 – Program pro liberaci – 1 cela

<u>Příkaz</u>	<u>Parametr</u>
---------------	-----------------

Loop Start (#)	12
----------------	----

### 'aspiration of carrier

Syringe Pump Command	KOR
----------------------	-----

Syringe Pump Valve In

'peristaltic pump on

Syringe Pump Flowrate ( $\mu\text{l}/\text{sec}$ )	70
--	----

Syringe Pump Aspirate ( $\mu\text{l}$ )	1200
---	------

Syringe Pump Delay Until Done

### 'aspiration of the sample first time

Syringe Pump Valve Out

Multiposition Valve	port 2
---------------------	--------

Syringe Pump Flowrate ( $\mu\text{l}/\text{sec}$ )	30
--	----

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Aspirate ( $\mu\text{l}$ )	100
---	-----

Syringe Pump Delay Until Done

### 'first send to waste

Multiposition Valve	port 1
---------------------	--------

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Flowrate ( $\mu\text{l}/\text{sec}$ )	70
--	----

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Empty

Syringe Pump Delay Until Done

Loop Start (#) 2

**'aspiration of carrier**

Syringe Pump Command KOR

Syringe Pump Valve In

Syringe Pump Flowrate ( $\mu\text{l}/\text{sec}$ ) 70

Syringe Pump Aspirate ( $\mu\text{l}$ ) 1000

Syringe Pump Delay Until Done

**'aspiration of the sample first time**

Analyte New Sample

Analyte Name tetracyklin

Syringe Pump Valve Out

Multiposition Valve port 2

Syringe Pump Flowrate ( $\mu\text{l}/\text{sec}$ ) 30

Syringe Pump Aspirate ( $\mu\text{l}$ ) 50

Syringe Pump Delay Until Done

Spectrometer Absorbance Scanning

**'first send to Detector**

Multiposition Valve port 5

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Flowrate ( $\mu\text{l}/\text{sec}$ ) 30

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Empty

Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

Spectrometer Stop Scanning

**'Doplňení rozpouštědla**

Multiposition Valve port 3

Syringe Pump Flowrate ( $\mu\text{l}/\text{sec}$ ) 50

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Aspirate ( $\mu$ l)	350
Syringe Pump Delay Until Done	
Multiposition Valve	port 2
Syringe Pump Dispense	320
Syringe Pump Delay Until Done	
Delay (sec)	94
Loop End	